

Patent Dept. (TR-E) - LITERATURE	
Case / Interne Nummer: 21329	Erfasst am 07-11-06 SMI

(43)公表日 平成7年(1995)3月30日

(51)Int.Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I
C 0 7 H 21/00		8615-4C	
C 0 9 B 69/10	Z	7306-4H	
C 0 9 K 11/06	Z	9159-4H	
C 1 2 Q 1/68	Z N A A	9453-4B	
G 0 1 N 33/533		8310-2J	
<div style="text-align: right;">           審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 18 頁) 最終頁に続く         </div>			

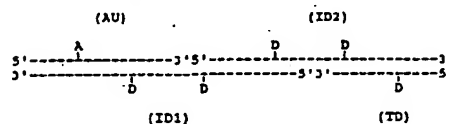
(21)出願番号	特願平5-508793	(71)出願人	ナノテクノロジー、インコーポレイテッド
(86)(22)出願日	平成4年(1992)11月6日		アメリカ合衆国92121カリフォルニア、サン・ディエゴ、スイート16、ソレント・バレー・ロード11588番
(85)翻訳文提出日	平成6年(1994)5月9日	(72)発明者	ヘラー、マイケル・ジェイ
(86)国際出願番号	PCT/US92/09827		アメリカ合衆国92024カリフォルニア、エンシニタス、ホーク・ビュー・ドライブ1614番
(87)国際公開番号	WO93/09128	(74)代理人	弁理士 青山 葆 (外1名)
(87)国際公開日	平成5年(1993)5月13日		
(31)優先権主張番号	790,262		
(32)優先日	1991年11月7日		
(33)優先権主張国	米国(US)		
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE), AU, CA, JP, US		

(54) 【発明の名称】 供与体-供与体エネルギー転移系を創製するための発色団および蛍光団でコンジュゲート化されたポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション

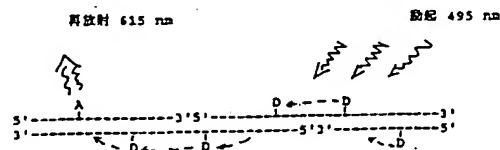
(57) 【要約】

本発明は、光子エネルギーを集め、このエネルギーを受容発色団に転移させる光子構造を形成させるための発色団含有ポリヌクレオチドであって、リンカーアームによってポリヌクレオチドに機能的に結合させた少なくとも2つの供与発色団（これら供与発色団は供与体-供与体移動距離で該ポリヌクレオチドの長さに沿って結合により配置されている）およびリンカーアームによってポリヌクレオチドに機能的に結合させた少なくとも1つの蛍光性の受容発色団（この蛍光性の受容発色団は供与発色団の少なくとも1つからの供与体-受容体移動距離で結合により配置されている）を有するポリヌクレオチド、ならびにこれら光子構造を利用する方法を意図するものである。

### 出立てられ組織化された構造



### 延長されたエネルギー移動



## 請求の範囲

1. リンカーアームによってポリスクレオチドに機能的に結合させた少なくとも2つの供与発色団を有するポリスクレオチドであって、該発色団が供与体-供与体移動距離で該ポリスクレオチドの長さに沿って該結合により配置されているポリスクレオチド。
2. 供与体-供与体移動距離が約1.4〜約6.1ナノメートルである請求項1に記載のポリスクレオチド。
3. 供与発色団が4,4'-ジイソチオシアナトジヒドロスチルベン-2,2'-ジスルホン酸、4-アセトアミド-4'-イソチオシアナトスチルベン-2,2'-ジスルホン酸、4,4'-ジイソチオシアナトスチルベン-2,2'-ジスルホン酸、スクシンイミジル ビレン プチレート、アクリジン イソチオシアネート、4-ジメチルアミノフェニルアゾフェニル-4'-イソチオシアネート(DABI TC)、Lucifer Yellow ビニルスルホン、フルオレセイン イソチオシアネート、Reactive Red 4(Cibacron Brilliant Red 3B-4)、ローダミンX イソチオシアネート、スルホローダミン101、マラカイトグリーン イソチオシアネートおよびIR1446からなる群から選ばれる請求項1に記載のポリスクレオチド。
4. 供与発色団が非蛍光性発色団である請求項1に記載のポリスクレオチド。
5. 少なくとも2つの供与発色団が2〜100の発色団からなる請求項1に記載のポリスクレオチド。
6. リンカーアームによってポリスクレオチドに機能的に結合させた少なくとも1つの蛍光性の受容発色団であって、供与発色団の少なくとも1つからの供与体-受容体移動距離で該結合により配置されている蛍光性の受容発色団をさらに含有する請求項1に記載のポリスクレオチド。
7. 供与体-受容体移動距離が約0.1〜約1.7ナノメートルである請求項6に記載のポリスクレオチド。
8. 蛍光性の受容発色団がビレン、Lucifer Yellow、アクリジン、リボフラビン、フルオレセイン、ローダミン、スルホローダミン101およびIR1446

チドを少なくとも1つの検定に十分な量で含有する診断検定システム。

17. 供与体-供与体移動距離が約1.4〜約6.1ナノメートルである請求項16に記載の診断システム。
18. リンカーアームによってポリスクレオチドに機能的に結合させた少なくとも1つの蛍光性の受容発色団であって、供与発色団の少なくとも1つからの供与体-受容体移動距離で該結合により配置されている蛍光性の受容発色団をポリスクレオチドがさらに含有する請求項16に記載の診断システム。
19. 供与体-受容体移動距離が約0.1〜約1.7ナノメートルである請求項18に記載の診断システム。
20. リンカーアームによって第2のポリスクレオチドに機能的に結合させた少なくとも1つの蛍光性の受容発色団を含有する第2のポリスクレオチドをさらに含有する請求項18に記載の診断システム。
21. 第1のポリスクレオチドが第2のポリスクレオチドに相補性のスクレオチド配列を含有しており、該相補性スクレオチド配列のハイブリダイゼーションによって蛍光性発色団が供与発色団の1つからの供与体-受容体移動距離に配置される請求項20に記載の診断システム。
22. 少なくとも2つのハイブリダイズしたポリスクレオチドからなる延長された光子エネルギー移動が可能な二本鎖核酸構造であって、(1)該構造のポリスクレオチドに結合させたリンカーアームによって該構造に機能的に結合させた少なくとも2つの供与発色団であって、供与体-供与体移動距離で該構造の長さに沿って該結合により配置されている少なくとも2つの供与発色団、および(2)該構造のポリスクレオチドに結合させたリンカーアームによって該構造に機能的に結合させた少なくとも1つの蛍光性発色団であって、該供与発色団の少なくとも1つからの供与体-受容体移動距離で該結合により配置されている蛍光性発色団、を有する二本鎖核酸構造。
23. 供与体-供与体移動距離が二本鎖のポリスクレオチドの間を交差するように、供与発色団が構造上に交互に配置されている請求項22に記載の構造。
24. 少なくとも3つの供与発色団を有し、該供与発色団が単一のポリスクレ

オチドから選ばれる請求項6に記載のポリスクレオチド。

9. リンカーアームによってポリスクレオチドに機能的に結合させた少なくとも2つの供与発色団を有する第1のポリスクレオチドであって、該供与発色団が供与体-供与体移動距離で該ポリスクレオチドの長さに沿って該結合により配置されており、延長されたエネルギー移動が可能な第1のポリスクレオチドを含有する光子エネルギー移動システム。
10. 供与体-供与体移動距離が約1.4〜約6.1ナノメートルである請求項9に記載の光子エネルギー移動システム。
11. リンカーアームによってポリスクレオチドに機能的に結合させた少なくとも1つの蛍光性の受容発色団であって、供与発色団の少なくとも1つからの供与体-受容体移動距離で該結合により配置されている蛍光性の受容発色団をポリスクレオチドがさらに含有する請求項9に記載の光子エネルギー移動システム。
12. 供与体-受容体移動距離が約0.1〜約1.7ナノメートルである請求項11に記載の光子エネルギー移動システム。
13. リンカーアームによって第2のポリスクレオチドに機能的に結合させた少なくとも1つの蛍光性の受容発色団を含有する第2のポリスクレオチドをさらに含有する請求項9に記載の光子エネルギー移動システム。
14. 第1のポリスクレオチドが第2のポリスクレオチドに相補性のスクレオチド配列を含有しており、該相補性スクレオチド配列のハイブリダイゼーションによって蛍光性発色団が供与発色団の1つからの供与体-受容体移動距離に配置される請求項13に記載の光子エネルギー移動システム。
15. 構造が固体支持体に結合している請求項9に記載の光子エネルギー移動構造。
16. 予め選択したスクレオチド配列の光子検出のための診断検定システムであって、該予め選択したスクレオチド配列に相補性のスクレオチド配列を含むポリスクレオチドが、リンカーアームによって該ポリスクレオチドに機能的に結合させた少なくとも2つの供与発色団を有し、該供与発色団が供与体-供与体移動距離で該ポリスクレオチドの長さに沿って該結合により配置されているポリスクレ

オチドで測定したときに4〜18スクレオチド増基単位離れて配置されている請求項23に記載の構造。

25. 光子エネルギー感知手段ならびにリンカーアームによってポリスクレオチドに機能的に結合させた少なくとも2つの供与発色団およびリンカーアームによってポリスクレオチドに機能的に結合させた少なくとも1つの蛍光性の受容発色団を有するポリスクレオチドからなるバイオセンサーであって、該供与発色団が供与体-供与体移動距離で該ポリスクレオチドの長さに沿って該結合により配置されており、該蛍光性の受容発色団が該供与発色団の少なくとも1つからの供与体-受容体移動距離で該結合により配置されており、該感知手段が該受容発色団から放射される光子エネルギーを検出するように該ポリスクレオチドが該感知手段に隣接して検出可能ように配置されているバイオセンサー。
26. 供与発色団が4,4'-ジイソチオシアナトジヒドロスチルベン-2,2'-ジスルホン酸、4-アセトアミド-4'-イソチオシアナトスチルベン-2,2'-ジスルホン酸、4,4'-ジイソチオシアナトスチルベン-2,2'-ジスルホン酸、スクシンイミジル ビレン プチレート、アクリジン イソチオシアネート、4-ジメチルアミノフェニルアゾフェニル-4'-イソチオシアネート(DABI TC)、Lucifer Yellow ビニルスルホン、フルオレセイン イソチオシアネート、Reactive Red 4(Cibacron Brilliant Red 3B-4)、ローダミンX イソチオシアネート、スルホローダミン101、マラカイトグリーン イソチオシアネートおよびIR1446からなる群から選ばれる請求項25に記載のバイオセンサー。
27. 供与発色団が非蛍光性発色団である請求項25に記載のバイオセンサー。
28. 少なくとも2つの供与発色団が2〜100の発色団からなる請求項25に記載のバイオセンサー。
29. 供与体-供与体移動距離が約1.4〜約6.1ナノメートルであり、供与体-受容体移動距離が約0.1〜約1.7ナノメートルである請求項25に記載のバイオセンサー。
30. 核酸を含有する試料中の予め選択した核酸配列の存在を検出するための方法であって、以下の工程からなる方法：

(a)以下の成分を混合してハイブリダイゼーション反応混合物を得：

(i)リンカーアームによってポリヌクレオチドに機能的に結合させた少なくとも2つの供与発色団であって、供与体-供与体移動距離で該ポリヌクレオチドの長さに沿って該結合により配置されている供与発色団、(ii)リンカーアームによって該ポリヌクレオチドに機能的に結合させた少なくとも1つの蛍光性の受容発色団であって、該供与発色団の少なくとも1つからの供与体-受容体移動距離で該結合により配置されている蛍光性の受容発色団、を有するポリヌクレオチドであって、標的配列にハイブリダイズするように適合させた予め選択した核酸配列を有するポリヌクレオチド、および

(iii)該予め選択した核酸塩基配列を含有する該核酸含有試料；

(b)該ハイブリダイゼーション反応混合物を、該ポリヌクレオチドが該予め選択した核酸塩基配列にハイブリダイズして供与発色団と受容発色団を含有するハイブリダイズした核酸二本鎖を形成するのに十分な時間、ハイブリダイゼーション条件下に置き；

(c)工程(b)で形成させた核酸二本鎖中の供与発色団を、該受容発色団からの光子エネルギーの放射を誘導するのに十分な光子エネルギーに暴露することによって、該供与発色団を励起し；そして

(d)該受容発色団から放射される光子エネルギーの存在を検出し、それによって試料中の予め選択した核酸配列の存在を検出する。

31. 核酸を含有する試料中の予め選択した核酸配列の存在を検出するための方法であって、以下の工程からなる方法：

(a)以下の成分を混合してハイブリダイゼーション反応混合物を得：

(i)リンカーアームによって第1のポリヌクレオチドに機能的に結合させた少なくとも2つの供与発色団であって、供与体-供与体移動距離で該第1のポリヌクレオチドの長さに沿って該結合により配置されている供与発色団を有する第1のポリヌクレオチド、

(ii)リンカーアームによって第2のポリヌクレオチドに機能的に結合させた少なくとも1つの蛍光性の受容発色団であって、標的配列にハイブリダイズさせ

#### 明 細 書

供与体-供与体エネルギー転移系を創製するための発色団および蛍光団でコンジュゲート化されたポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション

#### 技術分野

本発明は、直接導入された電子/光子転移の性質を有する修飾化合成核酸ポリマー/オリゴマーの設計および合成に関する。特に、本発明は低強(延長)された指向性の非放射エネルギー転移(移動)の性質に関係する。これらの独特の成分を、さらに大きくさらに複雑な構造に自己相対および組織化するようにプログラムすることができる。これらの直接導入された電子/光子の機能的性質は、これら組織化された構造内に関連および新規な機序が形成されることを可能にする。これら性質の組合せは、最終的に、有用な光子および光電装置、DNAバイオセンサー、ならびにDNA診断検定系の創製を可能にする。

#### 発明の背景

分子電子工学/光子工学およびナノテクノロジーの分野は、未来に対して大きな技術的有望性を与える。ナノテクノロジーは、対象を複雑かつ極めて小さな仕様に組み立てる総合的能力に基づく計画された技術と定義される(Drexler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 5275-5278 (1981))。ナノテクノロジーは、複雑な構造のあらゆる部分を原子レベルに組織化および相対するための、原子による原子または分子による分子の制御を意味する。ナノテクノロジーは、半導体や異質結晶工業において使用されている現在のリソグラフィ技術のようなトップ-ダウン方式とは対照的なボトム-アップ方式である。ナノテクノロジーの成功は、プログラム可能な自己相対分子単位および分子レベルの機械的手段(いわゆる相対して機であり、広範囲の分子構造および装置の構築を可能にするものである)の開発にかかっている[Drexler, 「創造のエンジン」, Doubleday Publishing Co., New York, NY (1986)]。即ち、ナノテクノロジーにおける第1のそして最も重要な目標の1つは、プログラム可能な自己相対分子構築単位の開発である。

たときに該供与発色団の少なくとも1つからの供与体-受容体移動距離を与えるように該第2のポリヌクレオチドに該結合により配置されている蛍光性の受容発色団を有する第2のポリヌクレオチド(これら第1および第2のポリヌクレオチドは、該標的配列にハイブリダイズし、それによって該供与発色団の少なくとも1つを該蛍光性受容発色団からの供与体-受容体移動距離に配置するように適合させた予め選択した核酸配列を有する)、および

(iii)該予め選択した核酸塩基配列を含有する該核酸含有試料；

(b)該ハイブリダイゼーション反応混合物を、該ポリヌクレオチドが該予め選択した核酸塩基配列にハイブリダイズして供与発色団と受容発色団を含有するハイブリダイズした核酸二本鎖を形成するのに十分な時間、ハイブリダイゼーション条件下に置き；

(c)工程(b)で形成させた核酸二本鎖中の供与発色団を、該受容発色団からの光子エネルギーの放射を誘導するのに十分な光子エネルギーに暴露することによって、該供与発色団を励起し；そして

(d)該受容発色団から放射される光子エネルギーの存在を検出し、それによって試料中の予め選択した核酸配列の存在を検出する。

現在の分子の電子/光子技術には、様々な分野の科学者および技術者の極めて多くの努力が含まれる[Carlier編, 「分子性の電子装置II」中, Marcel Dekker, Inc., New York, NY (1987)]。これらの分野には、有機ポリマーに基づく整流器[Weitzer, 「分子性の電子装置II」中, Carlier編, Marcel Dekker, New York, NY, p. 5-25 (1987)]、導電コンジュゲート化ポリマー[MacDiarmidら, *Synthetic Metals*, 18: 285 (1987)]、有機薄膜またはLangmuir-Blodgett膜の電子的性質[Valasekら, *Synthetic Metals*, 28: C473 (1989)]、電子移動に基づく分子シフトレジスター[Hopfieldら, *Science*, 241: 817 (1988)]、および合成によって修飾された物質(種々に異なる「置換」微小構造を形成する)に基づく自己相対系[Singhら, 「応用生物活性ポリマー物質」中, Plenum Press, New York, NY, pp. 239-249 (1988)]が含まれる。また、コンジュゲート化有機ポリマー[Bakerら, *Synthetic Metals*, 28: D639 (1989)]および非直線性有機材料[Polanskyら, *Proc. Annual Conf. IEEE in Medicine and Biology*, Part 4/8: 1302-1303 (1989)]に基づく分子性の光学または光子装置も記載されている。

しかし、これら引用した文献のどれも、精巧なあるいはプログラム可能なレベルの自己組織化または自己相対を記載していない。通常、電子性および/または光子性の機序を表現する実際の分子成分は、天然の生物学的タンパク質または他の分子である[Akaikeら, *Proc. Annual Conf. IEEE in Medicine and Biology*, Part 4/8: 1337-1338 (1989)]。現在のところ、効率的な電子性または光子性の構造、機序または装置を生み出す全合成によるプログラム可能な自己相対分子の例は存在しない。

生物学的な系における自己相対の理解の進展がナノテクノロジーに関係している[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 5275-5278 (1981); Drexler, 「創造のエンジン」中, Doubleday Publishing Co., New York, NY (1986)]。大きく進展した分野には、光を採取する光合成系、エネルギーを伝達する電子伝送系、視覚過程、神経伝達の機構、ならびにこれらの系を模倣するタンパク質成分の構造および機能が含まれる。いわゆるバイオチップは、分子性の電子装置を構築するために、合成または生物学的に改変したタンパク質を使用すると記載されている[Haddon

ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 1874-1878 (1985); McAllearら, 「分子性の電子装置」中, Carter編, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, pp. 622-633 (1987)]. 伝導性のネットワークを開発する目的で合成タンパク質(ポリペプチド)に関するいくつかの研究が行なわれている[McAllearら, 「分子性の電子装置」中, Carter編, Marcel Dekker, New York, NY, pp. 175-180 (1987)]. 他の研究者らは、核酸に基づくバイオチップがさらに有望であろうと考えている[Robinsonら, 「バイオチップの設計: 自己組立て型の分子スケールの記憶装置」, *Protein Engineering*, 1: 295-300 (1987)]。

また、すべての生体生物における遺伝情報の担体である核酸、デオキシリボ核酸またはDNAの構造および機能の理解に多くの研究が為されている[Teleonら, 「遺伝子の分子生物学」中, Vol. 1, Benjamin Publishing Co., Menlo Park, CA (1987)]。DNAにおいては、直線配列のヌクレオチド中の塩基単位 アデニン、グアニン、シトシンおよびチミン(A, G, CおよびT)によって情報がコードされている。一本鎖のDNA(または、ポリヌクレオチド)は、ハイブリダイゼーションによってその相補性配列を認識して結合し、二本鎖の核酸二重螺旋を形成する独特の性質を有している。これは、核酸の固有の塩基対合の性質の故に可能となっている(AはTを認識し、GはCを認識する)。ある任意のポリヌクレオチド配列はその厳密な相補性配列にだけハイブリダイズするので、この性質は極めて高度な特異性を導く。

核酸の分子生物学に加えて、核酸の化学合成の分野でも大きな進展が為された(16)。この技術が発展したので、現在では自動装置により、長さが100ヌクレオチドを超える配列を15ヌクレオチド/時間の合成速度で効率的に合成することができ、さらに、核酸を官能基(蛍光団、発色団、親和性ラベル、金属キレート、化学的反応性基および酵素を含む)で修飾するための多くの技術が開発されている[Smithら, *Nature*, 321: 674-679 (1986); Agarwalら, *Nucleic Acids Research*, 14: 6227-6245 (1986); Chuら, *Nucleic Acids Research*, 16: 3671-3691 (1988)]。

核酸の合成および修飾の両方の進展の勢いは、臨床診断決定において、DNA

プローブ診断とも呼ばれる分野においてこれらを利用する可能性を開いた。DNAプローブ診断決定系に感度の高い蛍光検出の性質を付与するための検討において、単純な光子機序が修飾化オリゴヌクレオチド中に導入されている。この方法には、Förster(フェルスター)の非放射的エネルギー移動を行なう蛍光団および化学発光ラベルされたオリゴヌクレオチドが含まれる[Bellerら, 「感染性物質の迅速な検出および同定」中, Kingsbury編, Academic Press, New York, NY, pp. 345-356 (1985)]。Försterの非放射的エネルギー移動は、ある波長に励起された蛍光供与(D)基がその吸収したエネルギーを共鳴双電子カップリング過程によって適当な蛍光受容(A)基に移動させる過程である。適当な供与基と受容基の間のエネルギー移動の効率は、 $1/r^6$ の距離依存性を有している[Lakowiczら, 「蛍光分光学の原理」中, Plenum Press, New York, NY, 第10章, pp. 305-337 (1983)を参照]。

Bellerら(上記)の研究において、相補性核酸塩基の隣接位置に結合またはハイブリダイズし、次いで受容基による再放射の見地から効率的な蛍光エネルギー移動を生じるように、2つの蛍光団ラベルしたオリゴヌクレオチドを設計している。第1のオリゴヌクレオチドは3'末端位置が適当な供与基でラベルされており、第2のオリゴヌクレオチドは5'末端位置が適当な受容基でラベルされている。相補性配列への結合またはハイブリダイゼーションにより、蛍光供与基と蛍光受容基が最も効率的なFörsterの非放射的エネルギー移動のための最適距離(理論的)となるようにこれらを配置する。しかし、受容基による再放射の見地からの観察されたエネルギー移動効率は、この特定配列に対しては比較的低いものであった(20%)。

その後の研究[Bellerら、欧州特許出願 No. EP0 0229943(1987); およびBellerら、US特許 4,996,143(1991年2月26日)]において、合成化学の進歩が、リンカーアームで修飾されたヌクレオチドを用いてオリゴヌクレオチド配列内のあらゆる位置に蛍光団を結合させる方法を与えた。また、この合成結合法を用いて、同じオリゴヌクレオチド内に供与および受容の両方の蛍光団を導入することが可能になった。特定のリンカーアームを用いて、最も効率的なエネルギー移動(受容

#### 発明の要約

本発明は、機能的な電子/光子の性質が直接導入された修飾化合成核酸ポリマー/オリゴマーの設計および合成に関する。特に、本発明は、拡張された非放射的エネルギー移動過程の性質を合成核酸の配列中に導入することに関する。

ここに、通常のFörster距離を超えて(>5nm)配置された複数の発色団供与基を配列させて末端の受容基に光子エネルギーを吸収および移動させることができ、これによりそれが光アンテナまたは光子伝導体として作用することを発見した。この性質は、配列させた供与基がある波長(hv<sub>1</sub>)の光子エネルギーを吸収し、結合した共鳴過程によってそれを受容基に指向的に移動させ、次いでそれがさらに長い波長(hv<sub>2</sub>)の光子エネルギーとして再放射せらるることに関係している。特別の供与発色団基(非蛍光発色団を含む)を適切な受容蛍光団と共に選択および相対配置させることにより、独特の性質を有する効率的な拡張されたエネルギー移動過程が導かれる。さらに、1次供与基を受容基に極めて近接して設置することを可能にするオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドの適切な設計が見い出された。

機能的な分子成分(発色団)の相対位置をヌクレオチド配列上でのそれらの配置によってプログラムすることができ、発色団を含有する核酸をさらに大きくさらに複雑な規定された構造に自己組立ておよび組織化するように設計することができる。これら分子成分のプログラム可能性および機能的な電子/光子の性質は、連結、増幅機序、およびアンテナ配列が核酸構造内に形成されることを可能にする。これら性質の組合せは、最終的に、光子装置、光電装置、バイオセンサー、ならびに均一および不均一DNA診断決定の創製を導く。

従って、本発明は、リンカーアームによってポリヌクレオチドに機能的に結合させた少なくとも2つ(複数)の供与発色団を有するポリヌクレオチドであって、これら発色団が供与体-供与体移動距離でポリヌクレオチドの長さに沿って結合により配置されているポリヌクレオチドを記述するものである。通常、供与発色団は非蛍光性の発色団である。

このポリヌクレオチドは、リンカーアームによって該ポリヌクレオチドに機能的

体による再放射の見地からは、供与体と受容体が5個の介在ヌクレオチド単位を隔ててまたは約1.7ナノメートル(nm)離れて位置しているときに生じることがわかった。さらに、Bellerら(US特許 4,996,143)は、ヌクレオチドの間隔が4から0単位(1.4nmから0nm)に減少するにつれてエネルギー移動効率が減少し、これがFörsterの理論に従わないものであることを示した。また、ヌクレオチド間隔が6から12単位(2.4nmから4.1nm)に増加するにつれてエネルギー移動効率が減少し、これはFörster理論に従うことがわかった。その当時、何故さらに近く配置された供与体と受容体の配列がエネルギー移動効率の減少を示し、Förster理論に従わないのかについては、説明も理解もされなかった。特に、Bellerらの教示は、>5nmのFörster距離を超える供与体からの拡張されたエネルギー移動および複数の供与体共鳴に向けられたものではなかった。

蛍光エネルギー移動は、免疫診断および液体クロマトグラフィー分析を含む他の分野において利用されている[Morrisonら, *Anal. Biochem.*, 174: 101-120 (1988); およびGarnerら, *Anal. Chem.*, 62: 2192-2198 (1990)]。また、核酸における単純な蛍光供与/受容エネルギー移動の最初の証明の一部は、他の研究者によって確立された[Cardulloら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 8790-8794 (1988); およびMorrisonら, *Anal. Biochem.*, 183: 221-244 (1989)]。Cardulloらの研究において、2つの短い(12マー)オリゴヌクレオチド配列(それぞれがローグミン受容体で末端ラベルされ、相補性の29マー配列にハイブリダイズされている)をいくつかの挿入供与体(アクリジノオレンジ)と結合させた配列を研究している。Cardulloによって記載された配列は、追加の供与体によるある程度の追加のエネルギー移動を示す。しかし、このエネルギー移動効率の増加は、供与体のどれも効率的な移動のために必要なFörster距離を超えて機能するとは記載されていないので、直接の供与体から受容体への移動に完全に一致している。現在まで、複数の供与体からのそして通常のFörster距離を超えた受容体への拡張(延長)されたエネルギー移動が可能な組織化された構造に関する記載は全く存在していない。

的に結合させた蛍光性の受容発色団であって、複数の供与体が励起光を集め、それを受容体に移動させ、次いで受容体が集めた光を再放射することができるよう供与発色団からの供与体-受容体移動距離で結合により配置されている蛍光性の受容発色団をさらに含有することができる。

別の態様においては、ハイブリダイゼーションしたときに受容蛍光性発色団が少なくとも1つの供与発色団に対して供与体-受容体移動距離になるように、1を超えるポリヌクレオチド上に供与発色団と受容発色団を共置させることができる。即ち、ポリヌクレオチドの組合せは、予め選択した配列ならびに必要な供与および受容発色団(本明細書に記載した様々な用途に適合させることができる)を含むことが意図されている。

例えば、上記のような供与体-供与体移動可能なポリヌクレオチドを含有する診断検定系が記載されている。この系は、別のポリヌクレオチド上に存在する受容発色団を利用することができる。また、この受容発色団は供与発色団と同じポリヌクレオチド上に存在することができる。

ポリヌクレオチドの配列を相補性ハイブリダイゼーションのために選択し、供与体-供与体移動および最終的な供与体-受容体移動が可能なら大きな構造の組立てを容易にすることができる。また、ポリヌクレオチドの配列を標的核酸配列に相補性であるように選択して、これらポリヌクレオチドを診断に用いて試料中の標的配列を検出するようにすることができる。

他の態様においては、本発明は、通常の相補性ヌクレオチド塩基ハイブリダイゼーションによって共にハイブリダイズした少なくとも2つのポリヌクレオチドからなる核酸二本鎖の形態の構造を記述する。複数のポリヌクレオチドをハイブリダイズさせて図3に示すような二本鎖を形成させることができる。これらポリヌクレオチドは機能的に結合した供与および受容発色団を含有しており、開示した供与体-供与体および供与体-受容体エネルギー移動が起こりうるさらに大きな構造を与える。これら発色団は二本鎖構造の1本の鎖に於て配列させることができるが、エネルギー移動が二本鎖の鎖の間を交互に渡るように配置するのが好ましい。

部に平易にするために図示している。

図2Aは、鎖型DNAオリゴマーにハイブリダイズまたは会合した1本のDNAポリヌクレオチド鎖に導入されている複数の供与基(D)と1個の受容基(A)を図示するものである。図2Bは、鎖型DNAポリマー上の組織化された構造中に組立てられた複数の供与DNAポリマーと受容DNAポリマーを示す。

図3の上部は、4つのオリゴヌクレオチド: 15マーの受容体単位(AU)、30マーの中間供与体1単位(ID1)、29マーの中間供与体2単位(ID2)、および末端供与体単位(TD)から組立てられ組織化された実施例1に記載した例示の14nm光子アンテナ構造を図示するものである。この図の下部は、この組立てた構造を495nmの光で照射したときの延長されたエネルギー移動を示す。波線は照射または放射光子を示し、点線の矢印(-----)は延長されたエネルギー移動過程の方向を示す。

図4は、実施例3に記載した延長されたエネルギー移動に基づく均一DNAハイブリダイゼーション検定法を示す。示したポリヌクレオチドには、複数の供与体を含むオリゴマー(MDO)、受容体オリゴマー(AO)、クエンチャー(消光)オリゴマー(QO)、および標的DNAが含まれる。図4Aは、標的DNAを酸性する際の均一系を示す。受容体基はクエンチャー基の基部にあり、従って受容体からの放射が消光されることに注意すべきである。図4Bは、標的DNAを酸性した後の均一系を示すものであり、これにより、複数の供与体および受容体オリゴマーが標的DNAの特定のプログラムされた相補性部位にハイブリダイズして、延長されたエネルギー移動が可能構造を生成する。

(以下、余白)

さらに、リンカーアームによってポリヌクレオチドに機能的に結合させた少なくとも2つの供与発色団を有する本発明のポリヌクレオチド(ここで、これら発色団は供与体-供与体移動距離でポリヌクレオチドの長さに沿って結合により配置されている)および光子エネルギー感知装置からなるバイオセンサー装置が意図されている。このバイオセンサーは、リンカーアームによってポリヌクレオチドに機能的に結合させた少なくとも1つの蛍光性受容発色団であって、供与発色団の少なくとも1つからの供与体-受容体移動距離で結合により配置されている蛍光性受容発色団を有している。さらに、供与発色団の励起により受容発色団から放射される光子エネルギーを感知手段が検出できるように、上記ポリヌクレオチドを感知手段に隣接して検出可能に配置する。

別の態様において、本発明は、核酸を含有する試料中の予め選択した核酸配列の存在を検出するための方法であって、本発明の1またはそれ以上のポリヌクレオチドをプローブとして使用することからなり、ハイブリダイゼーション現象を示すための検出可能な蛍光受容体放射を生じさせるために本明細書に記載のエネルギー移動系に基づく方法を意図するものである。

他の態様は本明細書中の開示に基づいて明らかとなるであろう。

#### 図面の簡単な説明

本開示の一部を構成する図面において、図1は、相補性の標的核酸鎖(標的配列: 配列番号3)上の隣接位置に結合またはハイブリダイズさせるために、どのように2つの発色団ラベルしたオリゴヌクレオチド(供与オリゴマー: 配列番号1、および受容オリゴマー: 配列番号2)を設計するかを示すものである。標的配列への結合またはハイブリダイゼーションは蛍光供与基と蛍光受容基を予め選択した供与体-受容体移動距離に接近させ、これにより、この系をhv<sub>1</sub>の光子エネルギーで照射したときに供与基がこのエネルギーを吸収し、これを非放射性的エネルギー移動(-----)によって受容基に移動させ、この受容基がhv<sub>2</sub>でそれを再放射する。照射および放射光子は波線の矢印で示す。正確なヌクレオチド配列ならびに供与基および受容基の位置は、この図の上部の未ハイブリダイズ(または、解離)の系で示す。ハイブリダイズした図(または、会合した系)は、この図の下

#### 発明の詳細な説明

##### A. 発色団含有ポリヌクレオチド

本発明は、機能的な電子/光子の性質を直接組み込んだ修飾合成核酸ポリマー/オリゴマーの設計および合成に関する。固有の認識特性(すなわち、相補的ハイブリダイゼーション)を有する合成核酸は、電子のおよび光子の構造ならびに強度へと自己組織化し得る分子成分を構築するための理想的な物質である。

1つの態様において、本発明は、受容発色団基および1またはそれ以上の第一の供与発色団をFörster距離内(< 5 nm)に有し、少なくとも2つの供与発色団または好ましくは複数の発色団が通常のFörster距離を超えて(> 5 nm)位置するポリヌクレオチドを意図している。受容体および供与発色団をリンカーアームによりポリヌクレオチドに機能的に結合させ、この発色団がポリヌクレオチドの全長に沿って本発明の開示により説明される共振エネルギー転移のために有効な供与体-供与体転移距離(1.4 nm~6.1 nm)に位置するようにする。

本明細書中で説明するポリヌクレオチドを形式化して種々の配置において用いることができる。供与発色団を1個のポリヌクレオチド上に存在させることができ、受容体発色団を予め選択されたハイブリダイゼーション現象によってのみ供与体-受容体転移距離中にみられる別個のポリヌクレオチド上に存在させることができる。または、受容体発色団を同じポリヌクレオチド上に1またはそれ以上の供与発色団と共に存在させることができる。

1つの態様において、ポリヌクレオチドはリンカーアームにより該ポリヌクレオチドに機能的に結合された少なくとも2つの供与発色団を有し、該供与発色団はポリヌクレオチドの全長に沿った結合により本明細書中に定義される供与体-供与体転移距離に位置する。好ましい供与体-供与体転移距離は約1.4~約6.1ナノメートルである。

このポリヌクレオチドは他の核酸配列に相補的になるよう選択された予め決定された配列を有し、これによりポリヌクレオチドを含有している発色団を(1)ハイブリダイゼーション工程により互いに自己組み立てして、基質化された光子または電子の構造を固体支持体または薄いフィルム例えばガラス、シリコン、ゲル

マニウム、ヒ化ガリウム、ポリマー、防露剤、ラングミュー・プロジェクト波などの上に形成させるかまたは(2)溶液中もしくは固体支持体もしくは薄いフィルム物質に結合した予め選択された標的核酸配列に結合させることをプログラムすることができ。

1つの態様において、末端または中心のポリヌクレオチドはリンカーアームにより該ポリヌクレオチドに機能的に結合された少なくとも1個の蛍光性受容体発色団をさらに含有し、該蛍光性受容体発色団は結合により少なくとも1個の第一のまたは主要な結合供与体発色団から約0.1 nm〜約1.7 nmの供与体-受容体転移距離に位置する。これらの配置は、本発明により説明される拡張された非放射的エネルギー転移をし得る組織化構造をもたらす。

本発明の目的のために、例のように記述しない限りは「オリゴヌクレオチド」、「オリゴマー」または「ポリヌクレオチド」の用語は、通常、DNA、RNAまたは全体として合成工程により製造される修飾配列を包含する一本鎖核酸ポリマーの形態の核酸を意味するであろう。技術的に、長さが2〜50ヌクレオチドの比較的短い配列はオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーと称し、比較的長い配列(>50ヌクレオチド)はポリヌクレオチドと称する。しかし、該用語は両方とも核酸ポリマーを示すから、本発明のためにこれら用語をその範囲において若干交換可能に用いる。

転移構造における複数の供与体および受容体を方向付ける配列を供給するための支持体構造としての合成DNAの重要な利点は：(1)2〜150ヌクレオチド単位(0.7 nm〜5.0 nm)の長さの、自動装置による迅速な合成；(2)それらのヌクレオチド配列による高い特異性を有するプログラム可能な認識；(3)蛍光団、発色団、親和性ラベル、金属キレートおよび酵素による容易な修飾；(4)それらの配列におけるあらゆる位置および塩基単位内のいくつかの場所での修飾可能性；(5)異なる性質を生み出す(例えば、通常は負に荷電されたDNAを中性の形態に作成することができる)ための修飾可能な骨格構造；(6)固体表面：ガラス、金属、シリコン、有機ポリマーおよびバイオ-ポリマーへの共有的および非共有的両方の結合可能性；(7)可逆的な組織化特性；(8)3次元および分岐構造を形

成する能力および(9)強く理解され容易にモデル化される構造および組織化特性である。

#### 1. 拡張されたエネルギー転移

本発明に関する特に機能的な電子的/光学的性質は非放射的(Förster)エネルギー転移工程である。基本的なFörsterエネルギー転移工程は、1波長( $h\nu_1$ )で光子エネルギーを吸収し、それを非放射的状態に結合工程を通じて比較的長い波長( $h\nu_2$ )で光子エネルギーを再放射する受容体に転移する供与基の能力に関与する。エネルギー転移効率は以下の式において与えられるパラメーターに依存する：

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (1)$$

$$R_0^6 = 9.8 \times 10^8 (k^2 n^4 Q_A J) / (A n) \quad (2)$$

[式中、E = 転移効率、r = 供与体と受容体の間の距離、k = 双極子配向因子、n = 媒体の屈折率、Q<sub>A</sub> = 供与体の量子収量、そしてJ = 供与体放射と受容体吸収の間の重なり程度を表す量なり全体]。他の全てのパラメーターが最適であるなら、高い効率のエネルギー転移が起こるために1/r<sup>6</sup>依存は供与体から受容体への距離が2 nm(20 Å)以下であることを必要とする。表1は供与体(D)から受容体(A)への距離範囲が0〜4.5 nmである場合の通常のFörsterエネルギー転移(ET)による理論的エネルギー転移効率を示す。

表1  
D/A距離(nm) 理論的ET効率(%)

D/A距離(nm)	理論的ET効率(%)
0	100
0.5	100
1.0	99
1.5	98
2.0	97
2.5	86
3.0	67
3.5	50
4.0	28
4.5	<10

図1は、2つの蛍光団-ラベル化オリゴヌクレオチド(供与体および受容体)を相補的な核酸配列の隣接位置に結合またはハイブリグイズさせ次いで効率的な蛍光エネルギー転移を生じさせるように設計するかを示している。エネルギー転移工程についての相対的な効率を、2つの非常に単純化された方法で表すことができる。第一の方法は転移されるエネルギーと供与体により吸収されるエネルギーの比によるものであり；これは受容体の存在下で発生する供与体の蛍光消光の相対的な量を測定することにより決定される。第二の方法は受容体により再放射されるエネルギーと供与体により吸収されるエネルギーの比による相対的な効率を表すものであり；これは供与基による受容体蛍光の相対的な増加を測定することにより決定される。両法はエネルギー転移効率の相対的な測定であると思われる一方で、供与体から受容体へのエネルギーの効率的な転移(供与体消光として見られる)は必ずしも受容体による再放射に対して同じ効率を導かない。これは第二の工程(受容体消光)が受容体にそのエネルギーを再放射による以外に放射させる場合に起こる。

拡張されたエネルギー転移は、1の波長( $h\nu_1$ )で複数の供与基が光子エネルギーを吸収する工程であり、エネルギーを受容基に指向的に転移させることのできる結合された共振構造を形成する。次いで、共振エネルギーを波長( $h\nu_2$ )で光子エネルギーとして再放射する。 $h\nu_1$ が非飽和である条件下で、光子エネルギーを供与基の配列により集めて適当な受容体に指向的に転移させ、 $h\nu_2$ での蛍光放射を大きく高めることができる。これは分子アンテナまたは増幅器機構とみなすことができる。または、光子エネルギー( $h\nu_1$ )を構造の一端で供与基により集めて、供与体の直線配列により該構造の他方の端の受容基に転移させ、そこで $h\nu_2$ として再放射することができる。この型の分子光子転移機構は光子ワイヤーまたは連絡線の同義語とみなすことができる。さらにこれら機構を用いて異なる分子構造を相互連絡し、分子構造を表面に連絡し、表面(単層)間の分子連絡を作成することができる。

従って、供与体発色団間の距離を選択して供与体-供与体転移距離を得るが、この距離は該転移が非放射的エネルギー転移であることを示す。同様に、末端供

与体発色団と受容体発色団の間の距離を選択して供与体-受容体転移距離を得るが、この距離は供与体による転移が非放射的であることを示し、蛍光受容体発色団の励起および続いて受容体からの放射スペクトルを与える。

#### 2. 発色団および蛍光団

本発明の新規な部分は、双極子結合によりエネルギーを転移し得る適当な供与体と受容体の対を形成するための特別な発色団および蛍光団基の選択および配置に関する。

発色団とは、有利な吸収特性を有する、すなわち任意の種々の光子源による放射により励起し得る基を意味する。発色団は蛍光性であるかまたは非蛍光性であってもよい。非蛍光発色団は通常、光子エネルギー( $h\nu_1$ )の形態にあるエネルギーを放射しない。ゆえにこれらの発色団は低い量子収量を有することを特徴とすることができ、この量子収量は放射光子エネルギーの吸収光子エネルギーに対する比であって、通常0.01より小さい。蛍光発色団は蛍光団と称し、通常は0.01〜1の中〜高量子収量で光子エネルギーを放射する。

本発明にとって特に重要であるのは、非蛍光発色団、例えば4-ジメチルアミノフルオロ-7-フルオロ-4'-イソチオシアレート(またはDABITC)が有効なエネルギー転移供与基として機能し得ることである。これら発色団供与基が適当な受容基に非常に近い(0.1 nm〜1.7 nm)場合には、これら供与基は受容体による有意な蛍光再放射を生じさせる。適当な受容体発色団にエネルギーを転移し得る発色団は本明細書中で供与体発色団または供与体と称する。

本発明の目的のための1つの受容体発色団は蛍光団であり、これは供与体発色団からのエネルギー転移を受容して放射スペクトルを生じることができる。双極子結合によるエネルギー転移は、供与体の放射スペクトルと受容体の励起スペクトルに重なりがある場合に通常生ずることができるから、「適当な」受容体は通常はその対応する適当な供与体よりも比較的長い波長に励起スペクトルを有する。この点において、供与体放射と受容体励起スペクトルを重ね合わせることに基づいてエネルギーを転移させる能力のために供与体および受容体を対合させることができる。ゆえに、2つの発色団が異なる放射スペクトルを有し、エネルギー転

移を進行するための十分な重なり合う供与体放射および受容体励起スペクトルを有している限り、能率的にあらゆる発色団を別の発色団と対合させて、受容体-供与体対を形成することができる。

受容体における蛍光再放射を生じる非蛍光供与体は非常に低値のある特性である。本発明の組成物における非蛍光供与体は、供与体による放射の程度が低いまたは欠如した特別の利点を提供し、そのため供与体-受容体系におけるバックグラウンドまたは検出可能な放射光に寄与しない。従って、非蛍光供与体は非常に低いバックグラウンドを可能にするものであり、特に好ましい。

このような非蛍光発色団からなる複数の供与体系は、固有の蛍光バックグラウンドをほとんど有さないであろう。この性質は、DNA診断アッセイ適用における蛍光エネルギー転移の実際の使用を非常に制限していた主な限界を克服する。さらにこれは、より有用な光子機構および適用を創造する機会を開く。

受容体における独特の性質に関して、最も高い量子収量を有するかまたは特異的な受容体放射と供与体に帰属されるバックグラウンド(非特異的)放射の間のシグナル対ノイズ比を増大させる別の性質を有する受容体が最も好ましい。シグナル対ノイズ比を減少させるアプローチの例には、比較的低放射を有する供与体、好ましくは非蛍光供与体の使用、供与体と受容体の放射スペクトルの間のスペクトル距離が最大化される受容体-供与体対の選択(好ましくは重なり合わないよう選択される)などの本明細書中でさらに説明するアプローチが含まれる。

表2は、本発明において開示される新規な拡張エネルギー転移機構および適用のための供与体、受容体および消光物質として用いることのできる可能性のある発色団および蛍光団の一部を列挙するものである。このリストは排他的であることを意図しておらず、これら独特で望ましい性質を与え得る供与体、受容体および消光物質のある種の具体的な型またはクラスを確認するものである。

特に好ましい供与体発色団は、4,4'-ジイソチオシアナトジヒドロステルベン-2,2'-ジスルホン酸、4-アセトアミド-4'-イソチオシアナトステルベン-2,2'-ジスルホン酸、4,4'-ジイソチオシアナトステルベン-2,2'-ジスルホン酸、スクシニミジルビレンブチレート、アクリジニイソチオシアネート、4-ジメチルアミノフェニルアゾフェニル-4'-イソチオシアネート(DABITC)、ルシフェルイエロー(Lucifer Yellow)ビニルスルホン、フルオレセインイソチオシアネート、リアクティブレッド4(Reactive Red 4)(Cibacron Brilliant Red 3B-A)、ローダミンXイソチオシアネート、テキサスレッド(Texas Red)(スルホローダミン101、増化スルホニル)、マラカイトグリーンイソチオシアネートおよびIR144\*からなる群から選択される。例示的な供与体発色団を実施例で説明する。

特に好ましい蛍光受容体発色団は、ピレン、ルシフェルイエロー、アクリジン、リボフラビン、フルオレセイン、ローダミン、スルホローダミン101、テキサスレッドおよびIR144\*からなる群から選択される。例示的な蛍光受容体発色団を実施例で説明する。

また、本発明のための有用な供与体または受容体発色団として意図されるものには、励起された電子などの電子シグナルが供与体-供与体転移系に入り、次いで共鳴エネルギーとして受容体へと転移されて電子シグナルとして系を出るのを可能にするであろう発色団、誘導体またはそれらの組み合わせが含まれる。換言すれば、本発明の供与体-供与体-受容体転移系に入りそしてそこから出る、またはその両方のための機構は、電子エネルギーを転移系の共鳴エネルギーに変換(そして再び戻す)して転移系が電子回路に伝達するために応答される発色団を必要とする。この方法において、本発明の拡張されたエネルギー転移系は電子コネクタまたはシグナル線路として機能することができる。電子エネルギーと共鳴エネルギーの間の可能な変換型には発光化合物、例えばルテチウム錯体、光電池などが含まれるが、これらに限定はされない。

### 3. 供与体および受容体対配置

表2に列挙した発色団および蛍光団から、効率的な拡張されたエネルギー転移

表2

拡張されたエネルギー転移過程および関連の光子機構のための供与体、受容体または消光物質として有用な発色団誘導体

誘導体 <sup>1</sup>	(EX) <sup>2</sup>	(EM) <sup>3</sup>	(QY) <sup>4</sup>
4,4'-ジイソチオシアナトジヒドロステルベン-2,2'-ジスルホン酸	286	なし <sup>5</sup>	<0.01
4-アセトアミド-4'-イソチオシアナトステルベン-2,2'-ジスルホン酸	328	438	M
4,4'-ジイソチオシアナトステルベン-2,2'-ジスルホン酸	342	419	M
スクシニミジルビレンブチレート	340	375, 395	0.6
アクリジニイソチオシアネート	393	419	M
4-ジメチルアミノフェニルアゾフェニル-4'-イソチオシアネート(DABITC)	430	なし <sup>5</sup>	<0.01
Lucifer Yellowビニルスルホン	438	540	0.2
フルオレセインイソチオシアネート	494	520	0.5
Reactive Red 4(Cibacron Brilliant Red 3B-A)	535	なし <sup>5</sup>	<0.01
ローダミンXイソチオシアネート	578	604	M-H
Texas Red(スルホローダミン101、増化スルホニル)	598	615	H
マラカイトグリーンイソチオシアネート	629	なし <sup>5</sup>	<0.01
IR144*	745	825	M

1: 上に列挙した蛍光団および発色団は、DNAポリマーに導入される第一アミノ基への直接結合に相当な誘導体化された形態で示されている。多くの場合において、他の型の誘導体(スクシニミジルエステルおよびハロアセチル)がアミノ基への結合のために利用可能である。さらに、スルフィドリルおよびアルデヒド官能基への結合に対して特異的な誘導体が可能である。

2: EXは吸収最大値のナノメートル(nm)である。

3: EMは放射最大値のナノメートル(nm)である。

4: 量子収量(QY)に対するおよその範囲は、「低(Low)」: 0.01~0.1; 「中(Medium)」: 0.1~0.3; および「高(High)」: 0.3~0.1である。

5: これらは本質的に中〜高吸収率を有する非蛍光(QY<0.01)有機化合物である。これらは発色団と称するのがより適当である。

6: IR144(Kodak Laser Dye)は誘導体化されておらず、DNAポリマーに結合させる前に修飾を必要とする。

過程および新規な光子機構を生じるであろう多くの供与体/受容体配置または配列を作成することができる。表2に示すこれらの配列には次のものが含まれる:

(1)エネルギーを1個または比較的少数の受容体に転移させる複数の供与体(蛍光および非蛍光)の配列。通常は、複数の供与体が1個の受容体に転移させるが、ある種の条件下および特定の光子機構については1以上の受容体を用いることもある。好ましい配列は非蛍光供与体を含むものであり、これは低バックグラウンドの拡張されたエネルギー転移工程という重要な利点を提供する。他の好ましい配列には可視領域において励起される複数の蛍光供与体が含まれ、これは赤外線領域において再放射する受容体に転移させる。これは、可視領域において生じる蛍光バックグラウンドにはるかに非感受性である光電子工学装置により赤外線放射を検出することができるから、有用な機構である。

(2)複数の供与体(蛍光および非蛍光)がhv<sub>1</sub>で光を吸収して中間の供与体-受容体に転移させ、これが次いで最終の受容体へと転移させ、この供与体がhv<sub>2</sub>で再放射する配列。これら配列は、系の励起波長(hv<sub>1</sub>)と放射波長(hv<sub>2</sub>)の間の大きなストークス・シフトを生じるという利点を有している。これは、励起と放射の分離が大きいほど系に対する蛍光バックグラウンドが低くなるので重要である。例示的な配置を表3に示し、表中3つの発色団を連続して示す。好ましい配列は、非蛍光または蛍光供与体から赤外線領域中に再放射する受容体へと転移させる配列である。好ましい型においては、IR144(Kodak Laser Dye)、可視領域において励起される供与体からの励起エネルギーを受容し次いで赤外線領域において再放射する発色団の使用を意図している。

(3)受容体による蛍光放射を防ぐために強い消光特性を有するある種の発色団を用いる特別配列。この態様において、本発明は消光物質発色団(または消光物質)の使用を意図しており、これは双極子結合によるエネルギーの転移を受容する受容体のような能力を有するが有意な放射を有さない。性質が非蛍光供与体と似ているが、消光物質の用語は、励起された受容体からエネルギーポテンシャルを引き離して、受容体が放射しない、すなわち受容体が消光されるように形成された非蛍光発色団を意味している。本発明の複数の供与体オリゴヌクレオチド



との組み合わせにおいて消光物質発色団を用いる例示的な配置を実施例3および図4に説明する。

消光発色団へのエネルギー転移のための機構は供与体-供与体または供与体-受容体転移、すなわち双極子結合のための機構と同じであり、このため転移距離および最適な対合配置に関して本明細書中に説明するものと同じ必要条件に従う。消光に適した例示的な非蛍光発色団はリアクティブレッド4またはマラカイトグリーンであるが、これはこれら物質が検出可能な放射を有さず、スペクトルの「赤」に位置していることを理由としており、ゆえに受容体が放射する前にエネルギーを受容体から受容する(消光する)ために種々の受容体発色団に比べてこれらを選択することができる。好ましい配列は非蛍光発色団についてはリアクティブレッド4またはマラカイトであり、これらはテキサスレッド受容基における蛍光を消光する。

表3

複数の供与体/受容体、複数の供与体1/受容体 供与体2/受容体、および特別な消光配列 (※好ましい*)
DABITC→フルオレセイン
*DABITC→テキサスレッド*
*DABITC→テキサスレッド→IR144*
ルシフェルイエロー→テキサスレッド
ルシフェルイエロー→フルオレセイン→テキサスレッド
*ルシフェルイエロー→テキサスレッド→IR144*
フルオレセイン→テキサスレッド
フルオレセイン→IR144
*フルオレセイン→テキサスレッド→IR144*
*テキサスレッド→IR144*
*マラカイトグリーン→テキサスレッド*
*リアクティブレッド4→テキサスレッド*

「→」は受容体による有意な再放射を導くエネルギー転移効果を示す。「:」は受容体の蛍光を有意に消光するエネルギー転移効果を示す。

比較的低い間隔の間隔設定を用いることができる。これらの交互になっている供与体型の構造は合理的な転移効率を維持し、第二の供与体-供与体消光を減少させ、ハイブリダイゼーションおよび組織化された構造の安定性への干渉が比較的小さい。

消光が望ましい性質である場合においては、消光基と受容基の間を0~5ヌクレオチド単位(0.1nm~1.7nm)の間隔にすることができ、消光体-受容体、供与体-受容体、ならびに供与体-供与体対を二本鎖DNA構造の交互の側に位置した基の間に形成することができることを留意すべきである。

#### 4. オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドの合成およびラベル化

オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチド配列の合成は、ポリヌクレオチドの新たな化学合成を含む任意の種々の方法を用いて、例えば現在利用可能な自動DNA合成装置および通常のホスホロアミド化学により、またはゲノム、プラスミドもしくは他のベクター中に遺伝子もしくは遺伝子の一部として存在する天然の核酸配列からの核酸フラグメントの誘導化、例えば比較的大きな二本鎖核酸の制限エンドヌクレアーゼ消化および組分離により、または核酸鋳型を用いる酵素的合成により行うことができる。

ポリヌクレオチドの新たな化学合成は任意の適当な方法、例えばホスホトリエステルまたはホスホジエステル法を用いて行うことができる。Marangら[*Meth. Enzymol.*, 68: 90 (1979)]; 米国特許番号4,356,270; Itakuraら[*Ann. Rev. Biochem.*, 52: 223-56 (1983)]およびBrownら[*Meth. Enzymol.*, 68: 109 (1979)]を参照。

核酸からのポリヌクレオチドの導出には、クロニングベクターによる適当な宿主への核酸のクロニング、ベクターの複製およびこれによるクローン化された核酸の量の増大、次いでクローン化された核酸のサブフラグメントの単離が含まれる。

核酸フラグメントのサブクローニングの説明については、Maniatisら[「分子クローニング: 実験室マニュアル」, Cold Spring Harbor Laboratory, pp 398-401 (1982)]および米国特許番号4,416,938および4,402,036を参照。

好ましい型において、Applied Biosystems Model 2381 DNA合成装置およ

上で説明した供与体、受容体および消光基の様々な配列および配置は、それらを1個のDNAポリマー内に組み込むか、またはDNA鋳型を用いて複数の供与体DNAポリマー、受容体DNAポリマーおよび消光DNAポリマーの様々な組み合わせを組み立てることによりなし得ることができ、これを示すことは重要である。両方の型の配置を図2に図式的に示す。

第一の「供与体から受容体」対の最適な配置または間隔、これによる供与体-受容体転移距離の形成に関して、Förster転移に対する基本的な $1/r^6$ 距離依存性は、効率的な(80~100%)エネルギー転移が起こるために基の間に0~5nmの間隔、好ましくは約0.1nm~約1.7nmの間隔を必要とする。1本および二本鎖DNAポリマーにおけるヌクレオチド間隔に関しては、この最適転移距離は0~5ヌクレオチド単位におよそ相当する。比較的小い分離距離で効率は理論的に100%に近づくことができる。>4.0nmまたは12ヌクレオチド単位の距離で、エネルギー転移効率は20%より低い。第一の供与体の受容体への結合については、近接した間隔設定(0、1または2塩基対)を実行することができるが、最適なエネルギー転移へと基を配向させていかなる第二の消光機構または励起転移も排除する特別なリンカーアーム作用を必要とする。

複数の供与体配列における「供与体から供与体」対の最適な配置または間隔、これによる供与体-供与体転移距離の形成について、近すぎる間隔での複数の供与体の組み込みは、高い特異性でハイブリダイズするDNAの能力に干渉し得る。さらに、供与体-供与体対の近接した間隔は、エネルギー転移効率を大きく減少させる第二の消光機構または励起転移をいずれ導入する可能性がある。現在、ポリヌクレオチド配列を内部および末端位置で修飾するための最も利用可能な化学的性質は、約4~約18ヌクレオチド単位(1.4nmから6.1nm)の供与体-供与体間隔設定を過度に長い距離にわたってなし得るのを可能にする。これは50ヌクレオチドの1個のオリゴヌクレオチド配列中に約10供与体が組み込まれ得ることを意味するであろう。相補的な複数の供与体ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションが、ここで4~9ヌクレオチド単位の間隔をとる供与体と有する交互になっている二本鎖構造を生じる場合には、8~18ヌクレオチド単位の

び市販品として入手可能(Applied Biosystems)な5'-ジメトキシトリチルヌクレオチドホスホノエチルホスホロアミド試薬および制御された孔ガラス合成カラムを用いた自動合成を、本特許出願において説明する研究のためにに行った。「通常のホスホロアミド化学」に加えて、RNA、リン酸水素およびホスホエートを含む他の化学作用を用いてもよい。

後のラベル化のための内部または末端官能基を有する修飾されたオリゴヌクレオチドは多くの方法で得られる。官能基を導入するためのいくつかの特に有用な方法を以下に説明する[合成方法に関するこの特定部分においては、「官能基の導入」は、蛍光団または発色団との後の結合のための化学的反応性基(第一アミン、スルフィド、ヒドロキシル、アルデヒドなど)を意味する; これを本発明の主要部分における電子的/光学的性質に関する「機能的性質の導入」と混同すべきではない]。

配列内の選択された位置ならびに3'および5'末端位置に、適当に保護されたリンカーアームヌクレオチド(5'-ジメトキシトリチル-5[N-(7-トリフルオロアセチルアミノヘプチル)-2'-デオキシリジン 3'-O-ホスホロアミド])として内部官能第一アミン基を導入することができる。このリンカーアームヌクレオチド(Glen Researchにより供給される)を自動合成工程で、容易に導入することができる。これは、様々な活性化蛍光団および発色団との後の結合反応のための第一アミン基(実際のリンカーアームの長さは1.5nmである)を提供する。

また、Aminolink 2を用いて第一アミン官能基を5'-末端位置に導入することができる。Aminolink 2は6個の炭素鎖アーム(0.9nm)および保護されたアミン基を有するホスホロアミド分子(Applied Biosystemsにより供給される)である。この適当に保護されたリンカー基を自動合成工程の終わりに5'-末端位置に導入することができ、これは様々な活性化蛍光団および発色団との後の結合反応のための第一アミン基を提供する。

デオキシリボヌクレオチドの代わりにリボヌクレオチドを用いた合成工程を開始させることにより、異なる型の官能基を末端位置に導入することができる。これはオリゴマーの3'末端位置にリボヌクレオチドを提供し、次いでこれを過



ウ素酸ナトリウムで酸化して種々の蛍光団および発色団と結合し得る反応性アルデヒド基を形成することができる。

オリゴヌクレオチドを機能化するこれらの工程は簡便的であることを意図しておらず、他の工程は、利用可能であるかまたは本発明の新規な概念をさらに可能にするために開発することができる。

各合成の終点で、完成したオリゴヌクレオチド(修飾または未修飾)を、濃縮水酸化アンモニウムによる55℃で12時間の処理により除去される支持およびブロック基から遊離させる。精製において助力となるようジメチルシリル基をオリゴヌクレオチド上に残すことができる。5'-トリチルオリゴヌクレオチドを逆相高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)により精製することができる。各オリゴヌクレオチド産物の純度を分析的ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定することができる。この時点で、未修飾のオリゴヌクレオチドは実験的使用への準備ができています。反応性リンカーアームを有するオリゴヌクレオチドを適当な活性化蛍光団と反応させることができる。

イソチオシアネート、塩化スルホニル、スクンシニジルエステルまたはトリアジンを含有する蛍光団および発色団誘導体を、第一アミン官能基を含有するオリゴヌクレオチドに容易に結合させることができる。3'-末端アルデヒド(過ヨウ素酸塩により酸化されたリボヌクレオチド由来)を含有しているオリゴヌクレオチドを第一アミノまたはヒドラジド基を有する蛍光団および発色団と反応させることができる。異なる蛍光団および発色団を機能化したオリゴヌクレオチドを導入するための多種多様な試薬および方法が存在する[Bioconjugate Chemistry, Vol. 1, 33, pp. 165-187 (1990): Sraen, R.H., 「核酸プローブ」, CRC Press, Inc. (1989); および Kellerら, 「DNA プローブ」, Stockton Press, (1989)を参照]。さらに、オリゴヌクレオチド(内部および末端)の直接的蛍光ラベル化は、蛍光(フルオレseinおよびアクリジン)ホスホアミダイト(Cleaveland)を用いて行うことができる。この方法を用いて、完全なヌクレオチドを蛍光ホスホアミダイト誘導体と置き換える。これらの誘導体を通常の自動DNA合成法の中で導入する。

性によりハイブリダイズして通常の二本鎖を形成する2またはそれ以上のポリヌクレオチドであるが、二本鎖の「鎖」は図3に示すような2またはそれ以上の隣接したポリヌクレオチドからなることもある。

従って、本発明の二本鎖性核酸構造は、少なくとも2つのハイブリダイズされたポリヌクレオチドからなる。この構造は、(1)該構造のポリヌクレオチドに結合されたリンカーアームにより該構造に機能的に結合した少なくとも2つの供与体発色団を有し、該供与体発色団は該構造の全長に沿った結合により供与体-供与体転移距離に配置される。またこの構造は、(2)該構造のポリヌクレオチドに結合されたリンカーアームにより該構造に機能的に結合した少なくとも1の蛍光発色団を有し、蛍光発色団は少なくとも1の供与体発色団からの供与体-受容体転移距離に結合により配置される。

図3に示す配置により示唆されるように、1つの懸縁は1またはそれ以上の交互の発色団の使用に関与し得る。すなわち、該構造はこの構造上に交互に配置される供与体発色団を含有し、該供与体-供与体転移距離は二本鎖のポリヌクレオチドの間で交互する(交互になる)ことができる。交互の配置は、一部の供与体-供与体転移が同じポリヌクレオチド上の隣接した供与体間にある(すなわち、交互)か、または全ての転移が交互であることができる。交互の転移距離は、本明細書中で説明するように供与体-供与体転移距離により表すかまたはヌクレオチド塩基間隔により表すことができる。従って、例えば交互の供与体発色団を有する構造は少なくとも3つの供与体発色団を含むことが意図されており、ここで供与体発色団は1個のポリヌクレオチド上で4〜18ヌクレオチド塩基単位離れて位置する。

別の懸縁は、光子エネルギー転移系または回路として複数の供与体にわたって伝達される光子エネルギー転移の能力の使用である。光子エネルギー転移系は本明細書中で説明する1またはそれ以上のポリヌクレオチド成分を有することができる。ゆえに光子エネルギー転移系は、上で説明した少なくとも2つの供与体発色団を有するポリヌクレオチドを含む。さらにこのポリヌクレオチドは受容体発色団を含んでいてよい。この系は、本明細書中で説明する様々な配置において1

##### 5. 懸縁、装置および系

機能的分子成分のプログラム可能性により、それらのヌクレオチド配列を通してそれらがさらに大きくそしてさらに複雑に規定される構造へと自己-組み立てして組織化するのが可能になることを強調するのは重要である。これらの分子成分のこのプログラム可能性および機能的電子/光学的性質は、光学的連結、増幅機構およびアンテナ配列が該構造内で組織化するのを可能にする。性質の組み合わせは、最終的には光子装置、光起電装置、バイオセンサーおよび均一ならびに不均一DNA診断アッセイの創製を導く。

各々が多くの供与基を含有する多数のDNAポリマーを共に組織化することができるから、比較的大きなアンテナまたは増幅器ネットワークを構築するかまたは長い光子転移および連結を作成することが可能である。増幅またはアンテナ機能のための拡張されたエネルギー転移に関して、ある分子構造または系における受容体に対する供与体の数はいくつかの因子に依存する。これらには、(1)最終の系に影響を与える光束(強度); (2)供与体配列についての全体のエネルギー転移効率; (3)供与体および受容体の量子収量(QY)および(4)供与体および受容体励起状態の寿命( $\tau$ )が含まれる。アンテナまたは光子増幅への適用のために、低〜中程度の光で、供与体の受容体に対する数は2対1および好ましくは10対1の下限から10<sup>4</sup>対1の上限までの範囲であろう。不均一DNA診断およびバイオセンサーへの応用のために、供与体の受容体に対する数は2対1および好ましくは5対1の下限から10<sup>4</sup>対1の上限までの範囲であろう。蛍光分析のための通常の分光蛍光計または他の計器において見られる通常の水相またはキセノン光源を用いる均一DNA診断への応用のために、供与体の受容体に対する数は2対1の下限から10<sup>4</sup>対1の上限までの範囲であろう。さらに、ある種の光子機構および特定の装置への応用のために、複数の供与体DNAポリマーが1以上の受容基を有する受容体DNAポリマーに転移させてもよい。上で与えられた供与体の受容体に対する基本的な比と同じものが、1以上の受容基を有する受容体DNAポリマーを有する分子構造または系に対して適用される。

本発明の装置を二本鎖核酸構造により説明することができ、これは通常の相補

またはそれ以上の別のポリヌクレオチドを含むこともある。

本発明が説明する拡張された光子エネルギー転移のための構造および系の範囲で、1つの懸縁は、説明する構造、ポリヌクレオチド、複数のポリヌクレオチド二本鎖、光子エネルギー転移系などの、固体状態での使用を意図していることは理解されるであろう。すなわち、この系のポリヌクレオチドを固体支持体に機能的に結合(接着)させて拡張されたエネルギー転移装置の使用を容易にすることができる。固体支持体系は特に電子装置、例えば光子エネルギーコレクター、光増幅器、エネルギー転移導管などに適している。

固体支持体へのポリヌクレオチドの結合は任意の種々の方法により行うことができ、限定されるものと解釈すべきではない。例示的な結合方法は本明細書中の他の部分で説明し、ポリヌクレオチド技術分野における当業者に通常周知のものである。

1つの懸縁において、固体支持体とは受動的な支持体を表すことができ、すなわち支持体は固体相におけるエネルギー転移ポリヌクレオチドをただ保持するために受動的に作用する。別の懸縁において、固体支持体は反応性であってよく、すなわちこの支持体は、エネルギーを転移系に与え、または受容体から第二の回路に放射光子エネルギーを放出、受容、変換、翻訳または伝達するための能力を有するなどの相補的な機能を提供する。例示的な第二回路は固相媒体における感光装置、光起電などの装置である。

(以下、余白)

## B. 診断系と診断法

## 1. 診断系

本発明のキットの形態にある診断系は、少なくとも1回の検定に足る量の発明の発色団含有ポリヌクレオチドを、個別に梱包された試薬として含む。典型的にはこの梱包された試薬の使用説明書も含まれる。

典型的な場合、「使用説明書」は、試薬濃度、あるいは試薬と混合すべき試料の相対量、試薬/試料混合物の維持期間、温度、検出条件などの少なくとも1つの検定法パラメータを記述する具体的な表現を含む。

1つの態様として、本発明は、少なくとも1回の検定に足る量の、リンカーアームによってポリヌクレオチドに機能的に連結された少なくとも2つの供与発色団を有するポリヌクレオチド(ここにその供与発色団は該ポリヌクレオチドの長さに沿う結合によって供与体-供与体移動距離に配置される)からなる、予め選択されたヌクレオチド配列の光子検出のための診断系を包含する。このポリヌクレオチドは予め選択されたヌクレオチド配列(すなわち標的核酸配列)にハイブリッド形成するように設計されるので、これは標的核酸配列に相補的なヌクレオチド配列を含有する。標的核酸配列の相補性は試薬ポリヌクレオチド(すなわちプローブ)に適用されるので核酸診断技術の分野ではよく知られており、したがってここで詳述する必要はない。

もう1つの態様では、診断系のポリヌクレオチドが、蛍光性発色団が結合によって供与発色団の少なくとも1つから供与体-受容体移動距離に配置されるように、リンカーアームによってポリヌクレオチドに機能的に連結された少なくとも1つの蛍光性発色団をさらに含有する。この態様では、受容発色団と複数の供与発色団の両方が1つのポリヌクレオチド上に存在する。図2(a)に示す構造はその具体例である。

もう1つの態様では、診断系が、リンカーアームによって第2のポリヌクレオチドに機能的に連結された少なくとも1つの蛍光性発色団を含有する第2のポリヌクレオチドを含む。図2(b)に示す構造はその具体例である。

さらなる態様では、診断系が、典型的には別個の容器に入った、本発明の消光

ポリヌクレオチドをも含有する。包含される消光ポリヌクレオチドは受容体ポリヌクレオチドの少なくとも一部に相補的であり、好ましくは受容体ポリヌクレオチドに完全に相補的である。標的配列がハイブリッド形成混合物中に存在するとすれば、受容体はそれに優先的にハイブリッド形成することを確実にするために、消光ポリヌクレオチドは受容体ポリヌクレオチドより長さが短くなくてはならず、典型的には少なくとも10%短く、より好ましくは少なくとも50%短い。

本明細書に記述するあらゆる診断系の試薬は、すなわち本発明の発色団含有ポリヌクレオチドを、液体分散液として、あるいは実質上乾燥した粉末(例:凍結乾燥型)として提供することができる。また反応容器としての固体支持体および1またはそれ以上の緩衝剤を個別に梱包された要素としてこの診断検定系に含ませることもできる。

診断系に関して本明細書で議論する梱包は診断系で通例的に使用されているものである。「梱包」という用語は、固定された境界内で本発明の診断試薬を保持することができるガラス、プラスチック、紙、金属箔などの固体基盤または材料を意味する。したがって例えば梱包とは、意図する診断試薬を含有するために使用されるガラスバイアルであり得る。

## 2. 診断法

また本発明は、本発明の発色団含有構造によって生成する放射された光子エネルギーの検出をもたらすあらゆる診断法を包含する。放射が励起とそれに続く励起した供与発色団から受容発色団へのエネルギー移動の結果である限り、本法は少なくとも2つの段階からなる:

(1) 供与発色団が支持体の長さに沿って供与体-供与体移動距離に配置されるように、リンカーアームによって支持構造に機能的に連結された少なくとも2つの供与発色団を含有し、かつ、供与発色団の少なくとも1つから供与体-受容体移動距離を与える構造上の位置にリンカーアームによって支持構造に機能的に連結された少なくとも1つの蛍光性受容発色団をも含有する本発明の組織化された構造の励起。この励起は、「収束」現象としての供与発色団間の非放射型エネルギー移動を誘発するに足り、かつ、受容体自体が十分に励起されて光子エネルギーを放射し、

発色団を励起し、

(d) 励起した受容発色団から放射される光子エネルギーの存在を検出することによって、試料中の予め選択した核酸配列の存在を検出する。

関連する態様では、複数の受容体と少なくとも1つの受容発色団との両方を含有する1つのポリヌクレオチドの代わりに、受容発色団を含有するポリヌクレオチドとは別個の1またはそれ以上のポリヌクレオチド上に供与体が存在する点で、段階(a)の混合が相違する。

図2(b)と図3に例示するこの態様では、供与体と受容体の配置が、予め選択した核酸標的配列にハイブリッド形成した時のこれらの発色団の近接性と、それぞれのポリヌクレオチド上のそれらの結合位置の両方によって制御される。

もう1つの態様として、標的核酸配列を含有するポリヌクレオチドとのハイブリッド形成に関して標的配列と競争するように設計された核酸配列を有する、本明細書に記載の消光ポリヌクレオチドをハイブリッド形成混合物が含有してもよい。この態様を実施例3と図4に示す。

ハイブリッド形成反応混合物は、本発明のポリヌクレオチドプローブ(単数または複数)の有効量、標的核酸およびハイブリッド形成反応混合物に適合し得る他の成分を混合することによって調製される。

本法でハイブリッド形成されるべき標的核酸配列は、その試料が純度と濃度に関して核酸ハイブリッド形成反応に適合し得る形態にある限り、あらゆる核酸含有試料中に存在することができる。ハイブリッド形成に適合する程度に核酸を単離することは一般に知られており、様々な手段で達成することができる。例えば皮膚、筋肉、毛髪などの身体組織や、血液、血漿、尿、羊歯液、大腸菌液などの体液を含む様々な核酸含有試料から核酸を単離することができる。例えば、Wassilios [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)] および Ausubel et al. [Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons (1987)] を参照のこと。

ポリヌクレオチドプローブが試料中に存在する相補的な核酸配列にハイブリッド形成してハイブリッド形成産物(すなわち本発明の発色団含有ポリヌクレオチ

ド)の放射をもたらすように供与発色団と受容発色団の間の非放射型エネルギー移動を誘発するに足る光子エネルギー量である。

(2) 様々な光子センサーのいずれかの利用による結果的に放射された光子エネルギーの検出。

上述のように発色団を含有する組織化された構造は本明細書に記載する様々な配置のいずれであってもよい。特定の励起手段と検知手段は、手元にある系の必要に応じて広範囲に変化し得るし、また、要求される感度、粗ら込んだ供与発色団および受容発色団の励起および放射特性ならびに構造の適用に依存する。

とりわけ好ましい診断方法として、本発明は、核酸を含有する試料中の標的配列を検出するためのハイブリッド形成プローブとして本発明の発色団含有ポリヌクレオチドを用いる予め選択された核酸配列の光子検出の方法を包含する。

したがって、核酸含有試料中の予め選択された核酸配列の存在を検出するための診断法は、次の段階からなると考えられる:

(a) (i) (1) 発色団がポリヌクレオチドの長さに沿う結合によって供与体-供与体移動距離に配置されるように、リンカーアームによってポリヌクレオチドに機能的に連結された少なくとも2つの供与発色団と、(2) 蛍光性受容発色団が結合によって供与発色団の少なくとも1つから供与体-受容体移動距離に配置されるように、リンカーアームによってポリヌクレオチドに機能的に連結された少なくとも1つの蛍光性受容発色団、とを有するポリヌクレオチド(ここにポリヌクレオチドは予め選択された「標的」核酸配列に対して相補的になるように予め選択されたヌクレオチド配列を有する)を、(ii) 予め選択された核酸塩基(「標的」)配列を含有する核酸含有試料、と混合してハイブリッド形成反応混合物を形成させ、

(b) そのハイブリッド形成反応混合物を、ポリヌクレオチドが標的配列にハイブリッド形成し、供与発色団を含有する-ならびに受容発色団を含有する-ハイブリッド形成した核酸二本鎖を形成するに足る期間、ハイブリッド条件に付し、

(c) 受容発色団からの光子エネルギーの放射を誘発するに足る光子エネルギーに供与発色団をさらすことによって、段階(b)で形成した核酸二本鎖中の供与

ドプローブ(単数または複数)と標的核酸とを含有する錯体)を形成するに足る期間、ハイブリッド形成反応混合物をハイブリッド形成条件下の意図する方法で維持する。

「ハイブリッド形成条件」という表現とその文法的に等価な表現は、維持期間と共に用いられる場合、ハイブリッド形成反応混合物を、その混合物中の反応物と付随する試薬の濃度との関連で、ポリヌクレオチドプローブが標的配列とアニールして、典型的には核酸二本鎖を形成すること、を可能にするに足る時間、温度およびpH条件に付することを示す。ハイブリッド形成の達成に必要なそのような時間、温度およびpH条件は、当該技術分野ではよく知られているように、ハイブリッド形成されるべきポリヌクレオチドプローブの長さ、ポリヌクレオチドプローブと標的の間の相補性の程度、ポリヌクレオチドのグアニンおよびシトシン含量、所望のハイブリッド形成の濃度、ハイブリッド形成の速度論に影響を与え得るハイブリッド形成反応混合物中の塩または付加的試薬の存在に依存する。与えられたハイブリッド形成反応混合物についてハイブリッド形成条件を最適化する方法は当該技術分野ではよく知られている。

典型的なハイブリッド形成条件には4〜9のpH値に緩衝化された溶液の使用が含まれ、典型的なハイブリッド形成条件は18℃〜75℃(好ましくは約37℃〜約65℃、より好ましくは約54℃)の温度で、0.5秒〜24時間(好ましくは2分)の期間、行われる。

ハイブリッド形成はよく知られているように不均一形式でも不均一形式でも行うことができる。均一ハイブリッド形成反応は完全に溶液中で起こり、ポリヌクレオチドプローブとハイブリッド形成されるべき(標的)核酸配列の両方が溶液中に可溶型で存在する。不均一反応では反応媒質に不溶性の基盤が使用され、その基盤にポリヌクレオチドプローブまたは標的核酸を結合させる。例えば検定すべき身体試料を固体基盤に付着させて、それを原位置ハイブリッド形成に付することができる。

原位置ハイブリッド形成は典型的には通常約1ミクロン〜約100ミクロン(好ましくは約1ミクロン〜約25ミクロン、より好ましくは約1ミクロン〜約10

ミクロン)の厚さを有する組織の切片または区分の形態にある身体試料上で行われる。このような試料は市販の冷却保持装置を用いて調整することができる。

別法として、広く使用されている不均一形式はサザンブロット法であり、この場合、ゲノムDNAを制限酵素消化の後で電気泳動し、電気泳動したDNA断片をまず変性させた後、それを不溶性の基盤に移す。このブロット法では、次いでポリヌクレオチドプローブを、相補的な核酸(標的)配列を含有する固定化されたゲノム核酸にハイブリッド形成させる。

さらに、もう1つの広く使用されている不均一形式はライブラリースクリーニング法であり、この場合、多数のコロニー(典型的にはプラスミド含有細菌またはラムダバクテリオファージ含有細菌)をプレートに接種し、培養し、ブロットすることによって、不溶性の基盤上にクローン化された核酸のライブラリーを形成させる。次にブロットしたライブラリーをポリヌクレオチドプローブとハイブリッド形成させることによって、目的の核酸断片を含有する細菌コロニーを同定する。

典型的な不均一ハイブリッド形成反応には、標的含有核酸断片を付着させる固体基盤としてガラスライド、ニトロセルロースシートなどの使用が含まれる。

また、cDNAを形成させるための単離mRNAの逆転写、ジデオキシ配列決定およびポリヌクレオチドのハイブリッド形成が第1段階となるプライマー伸長反応を用いる他の手法のために行われるような均一ハイブリッド形成反応も好ましい。特定の核酸配列をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅する均一ハイブリッド形成反応はとりわけ好ましい。

標的配列を含有する核酸が二本鎖(ds)型である場合には、ハイブリッド形成反応を行う前にまず、そのdsDNAを加熱やアルカリ処理などによって変性させることが好ましい。dsDNAの変性はハイブリッド形成させるべきポリヌクレオチドとの混合に先立って行うことができるし、また、dsDNAをポリヌクレオチドと混合した後に行うこともできる。ポリヌクレオチド自体が二本鎖分子として提供される場合にも、ハイブリッド形成反応混合物中での混合に先立ってそれを変性させることができるし、また、それと同時に標的含有dsDNAを変

性させることもできる。

ハイブリッド形成反応混合物に混合するポリヌクレオチドの量は広範囲にわたることができ、その応用に依存するが、その応用もまた標的配列を検出するために必要とされる感度に依存する。均一ハイブリッド形成混合物については、発色団含有ポリヌクレオチドが1ミリリットル(ml)あたり約1〜1000ナノグラム(ng)の濃度(約2ヌクレオチド長のポリヌクレオチドの場合は好ましくは約10〜100μg/ml)で存在することができる。

主ポリヌクレオチド上に存在する受容発色団の量に関して、均一液体ハイブリッド形成混合物中では、1ポリヌクレオチドあたり1受容発色団のための検出のレベルは、100マイクロリットル(μl)あたり少なくとも約10<sup>4</sup>〜10<sup>6</sup>受容発色団分子である。

標的核酸が固相中に存在する場合のような不均一ハイブリッド形成混合物については、検出すべき核酸バンド1つもしくは標的核酸の2ミリメートル(mm)ドットブロットあたり少なくとも約10<sup>4</sup>〜10<sup>6</sup>分子の受容発色団量で、発色団含有ポリヌクレオチドをハイブリッド混合物に加える。代表的な応用は、サザンブロットまたはDNA配列決定用ゲル上に存在する核酸断片を、例えば蛍光的に標識されたプローブを検出するABI配列読み取り機を用いて検出することである。

#### C. 光子検出

本発明は、長距離にわたって拡張されるという複数供与体移動構造の能力ゆえに、光コレクターや光子伝導体などの光子装置に対応する。したがってその構造を光子エネルギーの線形伝導体として設計することができるし、あるいは光感受性光子スイッチ(すなわちバイオセンサー)として配列させることもできる。

したがって1つの態様として、本発明は、リンカーアームによってそのポリヌクレオチドに隣接的に連結された少なくとも2つの供与発色団を有する本発明のポリヌクレオチド(ここに該発色団は該ポリヌクレオチドの長さに沿う該結合によって供与体-供与体移動距離に配置されている)からなるバイオセンサーを包含する。このポリヌクレオチドはリンカーアームによって該ポリヌクレオチドに機能的に連結した少なくとも1つの蛍光性受容発色団を有する(ここに該蛍光性受

容発色団は該結合によって該供与発色団の少なくとも1つから供与体-受容体移動距離に配置されている)。

したがってこのバイオセンサーは、様々な長さであり得て、束められ移送された光子エネルギーを受容発色団に移送する光子コレクターを含有する。好ましくは、バイオセンサーが、集合してより明るい光子出力を与える複数の受容発色団を含有する。

受容体または受容体の集合に隣接して位置するのは、放射された光子エネルギーの存在を検出するための光子検知手段である。この検知手段は、光電子増倍管チューブ、放射された光を光感受性光電子増倍管に移送する微鏡光学系といった検知手段など、様々な光検出装置のいずれであってもよい。

#### 実施例

下記の実施例は本発明の例示を意図するものであって、限定を意図するものではない。

##### 1. 自己組織性の拡張されたエネルギー移動系の設計と合成

拡張されたエネルギー移動系の実験的な実証のために、5つの異なる特定配列蛍光オリゴヌクレオチドと、同じ配列の非機能化型とを設計し、合成した。これらは次のものを含む：

(1) 受容体18マー・オリゴヌクレオチド単位、5.4nm長、スルホホロダミン(Selforhodamine)101によって標識されている(AU)。

(2) 第1中間供与体30マー・オリゴヌクレオチド単位、10.2nm長、6ヌクレオチドもしくは2.4nmの間隔で隔てられた2つのフルオレセインで標識されている(ID1)。

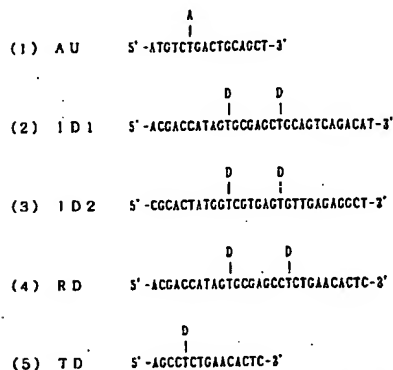
(3) 第2中間供与体29マー・オリゴヌクレオチド単位、9.9nm長、6ヌクレオチドもしくは2.4nmの間隔で隔てられた2つのフルオレセインで標識されている(ID2)。

(4) リポーター中間供与体30マー・オリゴヌクレオチド単位、10.2nm長、7ヌクレオチドもしくは2.7nmの間隔で隔てられた2つのフルオレセインで標識されている(RD)。このリポーター単位はその構造を拡張し得るよう

に設けられている。

(5) 末端供与体 15 マー・オリゴスクレオチド単位, 5.1 nm 長, 1 つのフルオレセインで標識されている (TD)。

上記のオリゴヌクレオチドすべての非修飾型をも合成した。すべてのオリゴヌクレオチドは、それらのコード化された配列によって互いの相補的部分に結合して直鎖状の二本鎖構造を形成するように設計されている。5つの修飾されたオリゴヌクレオチド配列中の特定の配列と蛍光標識〔A=スルホローダミン101(テナセス・レッド), D=フルオレセイン〕の位置を下に示し、それぞれを配列番号4~8と識別する。



上に示したオリゴヌクレオチド配列とその非機能化型はすべて、制御された多孔ガラス支持体上で標準的なホスホアミダイト化学を用いるアブライド・パイオンシステムズ 自動DNA合成機 モデル#381で合成した。機能化されたオリゴヌクレオチドの場合には、保護されたリンカーアームヌクレオシド(5'-ジメ

成分に関して約40%純粋であることが決定され、残りは単一標識化成分の混合物であった。中間供与体(2(D2))は二重フルオレsein標識化成分に関して約30%純粋であることが決定され、残りは単一標識化成分の混合物であった。反復供与体(RD)単位は二重フルオレsein標識化成分に関して約25%純粋であることが決定され、残りは単一標識化成分の混合物であった。末端供与体(TD)はフルオレseinによる標識化に関して95%純粋であることが決定された。中間供与体はフルオレseinで完全に二重に標識化されたが、それでも自己組織性系中での拡張されたエネルギー移動機構を立証するには適している。

ここで拡張されたエネルギー移動を示すために設計した実験の実験には、4オリスクレオチド単位(すなわち受容体単位(AU)、中間供与体1単位(I D1)、中間供与体2単位(I D2)および1つの末端供与体単位(TD))のハイブリッド形成による1.4 nm 長さの光子アンテナ構造の粗観化が示される。粗観化された構造と拡張されたエネルギー移動に関する概略図を図3に示す。

20℃の水性緩衝液(0.1M塩化ナトリウム/0.02Mリン酸ナトリウム、pH7.8)500μl中で濃度0.5ナノモル/μlの上記オリゴヌクレオチドを混合することによって、14nmアンテナ構造の会合した構造を形成させた。これらの条件は上記オリゴヌクレオチド単位がそれらの相協の配列に迅速にハイブリッド形成(1分)し、16nm直線状二本組構造を自己組織化(会合)するには適当である。

いくつかの実験対照構造をも同じ増基配座で会合させたが、その供与体単位の1またはそれ以上を非標識(NL)型とした。過度に効率的なよいフェルスター・エネルギー移動に関する潜在能力ゆえに、フルオレseinおよびスルホローダミン101を蛍光供与基および蛍光受容基として選んだ。組織化された14 nmアミンテナ構造は、受容体単位(AU)中のスルホローダミン基と中間供与体1単位(D1)中の第1フルオレsein基との間に6増基対(2.4 nm)の間隙(受容体-供与体移動距離)を有し、かつ、この配列の残りの部分にあるフルオレsein供与体のそれぞれの間に6増基対の間隙(供与体-供与体移動距離)を有するように設計されている。

トキシトリナール-5-トリフルオロアミノアルキル・デオキシウリジン)を上記の選択した位置に組み込んだ。このシンカーアームヌクレオシドは、活性化された発光基团[すなわちスルホローダミン(0.1塩化スルホニル(テキサス・レッド)とフルオレセイン・イソチシアナート(FITC))との反応のために1級アミンを提供する。

各合成の最後に、完成したオリゴヌクレオチドを支持体から切り離し、濃水酸  
化アンモニウムによる55℃で12時間の処理によって遮断基を除去した。ジメ  
トキシトリチル基は精製を助けるためにオリゴヌクレオチド上に残した。5'-  
トリチルオリゴヌクレオチドを逆相高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)で精製  
した。各オリゴヌクレオチド生成物の純度を分析用ポリアクリルアミドゲル電気  
泳動で決定した。

HPLCで精製した非作形型のオリゴスクレオチドは実験で使用する準備ができていた。次に活性なリンカーアーム(単数または複数)を含有するオリゴスクレオチドを適当な活性化蛍光団と反応させた。蛍光標識は、活性なリンカーアームを含有するオリゴスクレオチド500 ngをセルホーディング101増化スルホニ(チナス・レッド)もしくはフルオロエシエン・イソチオシアネート(共にモレキュラー・ブロープスから入手できる)1 mgと、0.1 M重炭酸ナトリウム(pH 8.5)100  $\mu$  l中で20°Cで2時間反応させることによって行った。反応が完了した後、その溶液をセファデックスG-25ゲル濾過カラムに通すことによって、過剰の蛍光団試薬を除去した。蛍光標識したオリゴスクレオチドの非標識物質からの最終的な精製は製剤用ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって行った。

精製した蛍光オリゴヌクレオチドと非修飾型オリゴヌクレオチドのすべてについてUV/可視スペクトル(240nm~600nm)を得た(ヒューレット・パカード・8451A・ダイオード・アレイ・スペクトロフォトメーター)。そのスペクトルデータから、濃度と蛍光標識化の程度を決定した。受容体単位(AU)はスカルダージン101(テキサス・レッド)による標識化に関して95%純粋であることが決定された。中鎖供体単位(1D1)は二重蛍光ラベリング標識化

フルオレseinは495 nm波長にその吸収(励起)極大(E<sub>X,ss</sub>)を持ち、520 nm波長に放射極大(E<sub>M,ss</sub>)を持ち、吸光係数は・72000である。スルホロダミン101(チキス・レッド)は595 nm波長に吸収(励起)極大(E<sub>X,ss</sub>)を持ち、615 nm波長に放射極大(E<sub>M,ss</sub>)を持ち、吸光係数は85000である。フルオレseinの幅広い放射バンドは500 nmから600 nmまで及び、520 nmから600 nm及びスルホロダミンの幅広い吸収バンドとよく重複している。放射バンドと吸収バンドのこの重複とそれぞれが発光団の高い量子収率ゆえに、これらはエネルギー移動にとって良好な一対となる。

会合した光子アンテナ構造における拡張されたエネルギー移動の立証は、495 nmでの放射でフルオレsein供与体単位を励起し、スルホローダミン101の受容体単位による615 nmでの放射の再放出を測定することによって行った。495 nmで励起することによって615 nmにおける基態チナキス・レッド蛍光放射を決定した(アミコ・ゴウマン・スペクトロフォトルオメーターを用いてこれらの実験を行った)。相対エネルギー移動効率(ET efficiency)とは、この系を495 nmで励起した場合の615 nm放射の、495 nmで励起した場合の615 nm放射に対する比率を100倍したものであり、次式で表すことができる:

$$ET_{eff} = EM_{i,j}(EX_{i,j}) / EM_{i,j}(EX_{i,j}) \times 100 \quad (3)$$

16ナノメートル光子アンテナ構造の自己組織化の可逆性の立証は、まず20℃で組織化した構造を会合させ、次いでそれを90℃に1分間加熱し、次にその系を20℃に冷却し直す(1分間)とによって行った。会合(最初)、加熱(加熱)および冷却(冷却)の工程の後に、各条件について上述のように励起と放射の測定を行った。様々な配置における拡張されたエネルギー移動の実験的立証と可逆性自己会合に関する結果を表4に示す。

表 4  
拡張されたエネルギー移動実験の結果

構造 <sup>a</sup>	温度 (°C)	EX (nm)	ET eff (%)
AU/ID1/ID2/TD	20	495	78
AU/ID1/ID2(NL)/TD(NL)	20	495	46
AU/ID1(NL)/ID2/TD	20	495	8
AU/ID1(NL)/ID2(NL)/TD(NL)	20	495	4
AU/ID1(NL)/ID2(NL)/TD(NL)	20	595	100
AU/ID1/ID2/TD <sup>b</sup> (最初)	20	495	73
AU/ID1/ID2/TD <sup>b</sup> (加熱)	90	495	6
AU/ID1/ID2/TD <sup>b</sup> (冷却)	20	495	77

<sup>a</sup>AU=スルホローダミン101を持つ受容体単位；ID1=2つのフルオレセインを持つ中間供与体1；ID2=2つのフルオレセインを持つ中間供与体2；TD=1つのフルオレセインを持つ末端供与体；NLはそのオリゴマーが構築されていなかったこと(フルオレセイン供与体なし)を意味する。

<sup>b</sup>可逆性自己会合を立証する実験であり、最初は20°Cで、90°Cに加熱し、20°Cに冷却し直した。

表4には、相関化された(AU/ID1/ID2/TD)アンテナ構造中で拡張されたエネルギー移動が起こり、全ての供与体単位が存在する場合に受容体単位(AU)に対して約78%のエネルギー移動効率をもたらすことが示されている。まさにID1単位のみが蛍光性である場合、つまりAU/ID1/ID2(NL)/TD(NL)系では、エネルギー移動は46%である。これは移動したエネルギーの30%がID2単位(これは受容体から20塩基対もしくは6.8nmに位置する第1供与体と有する)に由来していたことを示している。これは何らかの有意なエネルギー移動レベルを説明するのに必要なフルスター距離を十分に越えている。ID2単位とTD単位のみが蛍光性である場合、即ちAU/ID1(NL)/ID2/TD系では、エネルギー移動が約8%に低下する。これはID2単位とTD単位がID1単位を通してAU単位に移動していたことを示す他の結果の検証となるから、重要な結果である。AU/ID1(NL)/ID2(NL)/TD(NL)系の495nm励起での結果は単にAUに関するテキサス・レッド背

オリゴヌクレオチド(A)と(B)とをハイブリッド形成させると、受容体と供与体との間に5塩基対の間隔(2.0nm)が生み出される。テキサス・レッド(A)オリゴマーとフルオレセイン(B)オリゴマーに関してハイブリッド形成した配置を次に示し、それぞれを配列番号9~10と識別する。



オリゴヌクレオチド(A)に対応するが、フルオレセイン、DABITC、リアクティブ・レッド4またはマラカイト・グリーンの1つを有するオリゴヌクレオチドを個別に試験することによって、それぞれのオリゴヌクレオチド(B)上のテキサス・レッド受容体へのエネルギー移動能力を決定した。20°Cの水性緩衝液(0.1M塩化ナトリウム/0.02Mリン酸ナトリウム、pH7.8)500μl中で濃度0.5ナノモル/μlの上記オリゴヌクレオチド(A)および(B)を混合することによって、上記の構造を形成させた。これらの条件は上記オリゴヌクレオチド単位がそれらの相補的配列に迅速にハイブリッド形成(1分)するのに最適である。実験例1で記述した装置と手法を用いて蛍光分析実験を行った。

下記の結果が得られた：

(i)フルオレセインで構築したオリゴ(A)は、テキサス・レッドで構築した(B)にハイブリッド形成した時に、その配置を495nm(フルオレセインの励起極大)で励起すると、615nmにおける再放射として約55%のエネルギー移動をもたらした。これはこの系については過度に良好な効率である。しかし供与体からの有意な背景蛍光がまだ存在する。つまりフルオレセインからの蛍光放射(500nm~600nm)の45%がまだ存在する。

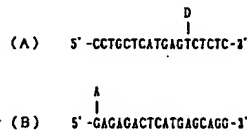
(ii)DABITCで構築したオリゴ(A)は、テキサス・レッドで構築したオリゴ(B)にハイブリッド形成した時に、その配置を430nm(DABITCの励

起(バックグラウンド)蛍光のレベルを示すものであり、595nm励起での結果はAUに関するテキサス・レッド蛍光の正常な、または基礎のレベルを与える。

会合、加熱および冷却実験は、この系が完全に順逆する90°Cにおけるエネルギー移動の完全な喪失と、系を冷却した場合のエネルギー移動能力の回復を示すことによって、この系の可逆性相関化特性を明確に立証している。

## 2. 有意な再放射を伴う非蛍光性供与体から蛍光性受容体へのエネルギー移動の立証

テキサス・レッドへエネルギー移動するいくつかの非蛍光性供与体と有意な再放射を導き得ることを立証するために、いくつかのオリゴヌクレオチドを設計し、合成した。「合成と構築」の項と実験例1に記述したものと同一基本的手法を用いて、2つの相補的18マー配列を合成し、構築した。下記オリゴヌクレオチド(A)を、その3'-末端位置から第6ヌクレオチド上の1級アミノ基で機能化(誘導体化)した。下記オリゴヌクレオチド(B)をアミノリンク2化学を用いて5'-末端アミノ基で機能化した。次にオリゴヌクレオチド(A)をフルオレセイン、DABITC(モレキュラー・プローブ)、リアクティブ・レッド4(シグマ・ケミカル)またはマラカイト・グリーン(モレキュラー・プローブ)で構築した。DABITC、リアクティブ・レッド4およびマラカイト・グリーンは非蛍光性の発色団である。オリゴヌクレオチド(B)をテキサス・レッドで構築した。これらのオリゴヌクレオチド配列を次に示し、それぞれを配列番号9~10と識別する：



[ここにD=フルオレセイン、DABITC、リアクティブ・レッド4またはマラカイト・グリーンであり、A=テキサス・レッドである]

起極大)で励起すると、615nmにおける再放射として約5%~10%のエネルギー移動をもたらした。しかし440nmにおけるDABITCの励起をちょうど越えたところから600nmにおけるテキサス・レッドの蛍光放射の始まりまで検出し得る蛍光放射型はなかった。これと同じ配置において、595nm(テキサス・レッドの励起極大)でこの配置を励起した場合、DABITCはテキサス・レッドの蛍光放射(615nm)の消光をほとんどもたらさないか、もしくは全くもたらさないものと思われる。

(iii)リアクティブ・レッド4で構築したオリゴ(A)は、テキサス・レッドで構築したオリゴ(B)にハイブリッド形成した時に、その配置を535nm(リアクティブ・レッド4の励起極大)で励起すると、610nmにおける再放射として陽性のエネルギー移動をもたらさなかった。リアクティブ・レッド4は、その配置を595nm(テキサス・レッドの励起極大)で励起した場合に、テキサス・レッドの蛍光放射(615nm)の80%以上の消光をもたらした。

(iv)マラカイト・グリーンで構築したオリゴ(A)は、テキサス・レッドで構築したオリゴ(B)とハイブリッド形成した時に、その配置を595nm(テキサス・レッドの励起極大)で励起すると、テキサス・レッドの蛍光放射(615nm)の60%以上の消光をもたらした。マラカイト・グリーンの励起極大は629nmにある。

上記(i)と(ii)に記述した結果は、5塩基対の間隔(2.0nm)にある非蛍光性発色団DABITCがテキサス・レッド受容体における有意な蛍光再放射をもたらし得ることを明確に示している。またDABITCはフルオレセインが有意な背景(45%)をもたらす領域と同じ領域で検出し得る背景蛍光をもたらさない。複数供与体系に関して、このことは、DABITCからの移動によってもたらされる再放射(5%~10%)がフルオレセインからのもの(55%)より低いという事実よりはるかに重要である。複数供与体系では、蛍光性供与体からの背景蛍光の相加的効果がその性能と有用性を極めて迅速に制約し得る。したがって複数供与体系での使用にはDABITCのような発色団がより理想的である。

上記(iii)および(iv)に記述した結果は、5塩基対(2.0nm)の間隔にある他

の非蛍光性発色団(リアクティブ・レッドとマラカイト・グリーン)がテキサス・レッド受容体の蛍光放射を有意に消光し得るということを立証している。これらの強力な消光基は、増幅された光子放射をスイッチ・オンおよびスイッチ・オフすることを可能にする機構を工夫する際に有用であり得る。したがって、これらにより新規で有用な光子機構または装置を作成する助けになる。背景を減じるために消光基を使用する有用な系の例を例4に記述し、図4に示す。

### 3. 拡張されたエネルギー移動に基づく均一DNAハイブリッド形成検定法

次に低蛍光背景の拡張されたエネルギー移動過程を使用する均一DNAハイブリッド形成検定法について記述する。この系には複数供与体、受容体および消光オリゴヌクレオチドが含まれる。

20~100ヌクレオチド長の複数供与体オリゴヌクレオチド(MDO)をDABITC(非蛍光性)供与基を用いて3~6塩基対の間隔で標識する。この複数供与体系は実施例1で議論した配置に類似するいくつかの複数供与体プローブの配置であってもよい。複数供与体オリゴヌクレオチドの少なくとも10~50ヌクレオチド部分は標的DNA配列の特定の部分に相補的である。

15~50ヌクレオチド長の受容体オリゴヌクレオチド(AO)を、その5'-末端位置か、もしくはその近傍でテキサス・レッドを用いて標識する。この受容体オリゴヌクレオチドは、複数供与体オリゴヌクレオチドに特異的な標的配列と連続するDNA標的配列の部分に対して相補的である。

10~45ヌクレオチド長の消光オリゴヌクレオチド(QO)を、その3'-末端位置か、もしくはその近傍でリアクティブ・レッド4を用いて標識する。この消光オリゴヌクレオチドは、受容体オリゴヌクレオチドに対して相補的にするが、消光オリゴヌクレオチドは5~10塩基分短く、消光オリゴヌクレオチドは、それが受容体オリゴヌクレオチドにハイブリッド形成した時に、リアクティブ・レッド4基がテキサス・レッド基の1~5塩基内にあって、テキサス・レッド蛍光の完全な消光をもたらすように構築される。

図4はこの均一検定法を示している。この手法はハイブリッド形成の分野で一般的な水性緩衝液を用いて行うことができる。最初に複数供与体オリゴヌクレオチド形成していない(一本鎖)オリゴヌクレオチドとしてこの均一系に供し、受容体

オリゴヌクレオチドにハイブリッド形成した系に消光オリゴヌクレオチドを供する。標的DNAはこの検定系中に既存させるか、もしくはこの時点で検定系に加える。次にこの系を、標的DNAの変性を引き起こす温度に加熱する。次にその系を冷却することによって、新しい特異的なハイブリッド形成を起こさせる。次いで供与体オリゴヌクレオチドが標的DNA上の相補的配列にハイブリッド形成し、受容体オリゴヌクレオチドが供与体の隣で標的DNAにハイブリッド形成する。両オリゴヌクレオチドは予め選択された標的配列に対して、計画した割合(ハイブリッド形成)時に末端供与基が受容体の3~6塩基対内に位置するように構築される。消光オリゴヌクレオチドは受容体よりも長さが短くなるように設計され、それゆえに受容体オリゴヌクレオチドを結合した標的へのハイブリッド形成に関して標的配列と効果的に競争することができない。ハイブリッドしていないあらゆる受容体オリゴヌクレオチドは消光オリゴヌクレオチドと再ハイブリッド形成する。この時点で標的DNAは、テキサス・レッド基への効率的なエネルギー移動のために、供与体オリゴヌクレオチドと受容体オリゴヌクレオチドを組織化している。蛍光分析によって標的DNAを定量的に決定することができる。

次に上記の割合を430nmで励起し、615nmにおける蛍光放射を決定する。この均一系は、複数受容体基のいずれか、ならびに、非標的ハイブリッド形成した受容体オリゴヌクレオチドのいずれかからの蛍光背景がないという特有の利点を有する。この特定の手法は、新しい拡張されたエネルギー移動環境に基づいて開発することができるいくつかの考え得る均一および不均一DNA検定系のほんの1つを表すにすぎない。

### 4. 緊密に接近した供与体-受容体配置における効率的なエネルギー移動の立証

次に、末端受容体(テキサス・レッド)がその一次供与体(フルオレセイン)から1ヌクレオチド単位(0.34nm)によって分離されているオリゴヌクレオチドにおける効率的なエネルギー移動の立証について記述する。このヌクレオチド配列におけるフルオレセイン供与体とテキサス・レッド受容体の配置を次に示す(配列番号11)：

5'-(TR)-G-(F)-GAGACTCATGACGACGGGCTAGC-3'

### 配列表

#### (1) 一般的情報

- (i) 特許出願人：ヘラー、マイケル・ジェイ
- (ii) 発明の名称：発色団および蛍光団を含有するポリヌクレオチドに基づく自己組織化の分子性光子構造ならびにその使用方法

#### (iii) 配列の数：11

#### (iv) 連絡先：

- (A) 名宛人：トーマス・フィッティング
- (B) 通り：スイート300、ハイ・プラザ・ドライブ12528番
- (C) 市：サン・ディエゴ
- (D) 州：カリフォルニア
- (E) 国：アメリカ合衆国
- (F) ZIP: 92130

#### (v) コンピューター解読書式：

- (A) 媒体型：フロッピー・ディスク
- (B) コンピューター：IBM PC適合
- (C) オペレーティング・システム：PC-DOS/MS-DOS
- (D) ソフトウェア：Patentia Release 81.0, Version 81.25

#### (vi) 本出願のデータ：

- (A) 出願番号：PCT/US92
- (B) 出願日：1992年11月6日
- (C) 分類：未定

#### (vii) 優先権主張出願のデータ：

- (A) 出願番号：US 07/790,282
- (B) 出願日：1992年11月7日

#### (viii) 弁理士/代理人情報：

- (A) 氏名：フィッティング、トーマス
- (B) 登録番号：34,183

上記の蛍光修飾オリゴヌクレオチドを既に記述した技術を用いて合成的に作成した。ただし上記オリゴヌクレオチドの5'-末端から2番目のヌクレオチドをフルオレセイン(F)ホスホアミダイト(クロンテック)に置き換えた。この第2ヌクレオチド位置を標準的なC6リンカーアミン(アミノリンク2)で官能化し、次いでそれをテキサス・レッドと反応させた。得られたオリゴヌクレオチド誘導体をポリアクリルアミドゲル(15%)電気泳動で精製した。

この蛍光ホスホアミダイト誘導体オリゴヌクレオチドに関する蛍光エネルギー移動を、まずその誘導体を相補的なオリゴヌクレオチドにハイブリッド形成させた後に行った。両オリゴヌクレオチドの濃度は25μg/mlであり、ハイブリッド形成は1×SSC(pH7.0)中室温で行った。490nmで励起すると、この誘導体はテキサス・レッド受容体による610nm再放射に関して、>50%のエネルギー移動をもたらした。このことは、2次的な消光機構が感じられない密接な間隔の供与体-受容体配置と、受容体再放射に関してより高いエネルギー移動が観測されることを明確に立証している。

上の記述は本発明の例示を意図するものであって、制約を意図するものではない。本発明の真の思想と範囲から逸脱することなく数多くの改変や修飾を施すことができる。

(以下、余白)

- (C) 参照/整理番号: HEL0005P
- (ix) 電話連絡先情報:
- (A) 電話番号: 819-792-3680
- (B) ファックス番号: 819-792-8477
- (2) 配列番号1の情報
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ: 10塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: DNA (genomic)
- (iii) ハイボセティカル配列: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (is) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号: misc feature
- (B) 存在位置: 10
- (D) 他の情報: /注「3'のTヌクレオチドのところに供与発色団」
- (xi) 配列: 配列番号1:  
ATGCATACCT 10
- (2) 配列番号2の情報
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ: 10塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: DNA (genomic)
- (iii) ハイボセティカル配列: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (is) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号: misc feature
- (B) 存在位置: 6
- (D) 他の情報: /注「スルホローダミン」01(Texas Red)でラベルされたTヌクレオチド」
- (xi) 配列: 配列番号4:  
ATGCTGACT GCAGCT 16
- (2) 配列番号5の情報
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ: 30塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: DNA (genomic)
- (iii) ハイボセティカル配列: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (is) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号: misc feature
- (B) 存在位置: 11
- (D) 他の情報: /注「フルオレセインでラベルされたTヌクレオチド」
- (ix) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号: misc feature
- (B) 存在位置: 18
- (D) 他の情報: /注「フルオレセインでラベルされたTヌクレオチド」
- (xi) 配列: 配列番号6:  
CCCACTATGG TCCTGACTGT TGAGAGGCT 29
- (2) 配列番号7の情報
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ: 29塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖

- (iv) アンチセンス: NO
- (is) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号: misc feature
- (B) 存在位置: 1
- (D) 他の情報: /注「5'のTヌクレオチドのところに受容発色団」
- (xi) 配列: 配列番号2:  
TGAGTAGGAT 10
- (2) 配列番号3の情報
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ: 20塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: DNA (genomic)
- (iii) ハイボセティカル配列: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (is) 配列: 配列番号3:  
ATCGTACTGA ACGTATGCCAT 20
- (2) 配列番号4の情報
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ: 16塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: DNA (genomic)
- (iii) ハイボセティカル配列: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (is) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号: misc feature
- (B) 存在位置: 6
- (D) 他の情報: /注「フルオレセインでラベルされたTヌクレオチド」
- (xi) 配列: 配列番号5:  
ACGACCATAG TGCGAGCTGC AGTCAGACAT 30
- (2) 配列番号6の情報
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ: 29塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: DNA (genomic)
- (iii) ハイボセティカル配列: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (is) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号: misc feature
- (B) 存在位置: 11
- (D) 他の情報: /注「フルオレセインでラベルされたTヌクレオチド」
- (ix) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号: misc feature
- (B) 存在位置: 18
- (D) 他の情報: /注「フルオレセインでラベルされたTヌクレオチド」
- (xi) 配列: 配列番号6:  
CCCACTATGG TCCTGACTGT TGAGAGGCT 29
- (2) 配列番号7の情報
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ: 29塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖



- (D) トポロジー:直鎖状
- (ii) 配列の種類: DNA (genomic)
- (iii) ハイボセティカル配列: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (ix) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号: misc feature
- (B) 存在位置: 11
- (D) 他の情報: /注-「フルオレseinでラベルされたTヌクレオチド」
- (ix) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号: misc feature
- (B) 存在位置: 19
- (D) 他の情報: /注-「フルオレseinでラベルされたTヌクレオチド」
- (xi) 配列: 配列番号7:  
ACGACCATAG TCGAGGCTC TGAACACTC 29

(2) 配列番号8の情報

- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ: 15塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー:直鎖状
- (ii) 配列の種類: DNA (genomic)
- (iii) ハイボセティカル配列: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (ix) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号: misc feature
- (B) 存在位置: 5
- (D) 他の情報: /注-「フルオレseinでラベルされたTヌクレオチド」

- (ix) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号: misc feature
- (B) 存在位置: 1
- (D) 他の情報: /注-「Texas RedでラベルされたGヌクレオチド」
- (xi) 配列: 配列番号10:  
GAGAGACTCA TGAGCAGC 18

(2) 配列番号11の情報

- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ: 24塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー:直鎖状
- (ii) 配列の種類: DNA (genomic)
- (iii) ハイボセティカル配列: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (ix) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号: misc feature
- (B) 存在位置: 1
- (D) 他の情報: /注-「5'のGヌクレオチドがその1次供与体フルオレsein(F)から末端Texas Red(TR)受容体を隔てる」

- (xi) 配列: 配列番号11:  
CGAGACTCAT GAGCAGGGC TAGC 24

- (xi) 配列: 配列番号8:  
AGCCTCTGAA CACTC 15

(2) 配列番号9の情報

- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ: 18塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー:直鎖状
- (ii) 配列の種類: DNA (genomic)
- (iii) ハイボセティカル配列: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (ix) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号: misc feature
- (B) 存在位置: 13
- (D) 他の情報: /注-「フルオレseinでラベルされたTヌクレオチド」
- (xi) 配列: 配列番号9:  
CCTGCTCATG AGTCTCTC 18

(2) 配列番号10の情報

- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ: 18塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー:直鎖状
- (ii) 配列の種類: DNA (genomic)
- (iii) ハイボセティカル配列: NO
- (iv) アンチセンス: NO

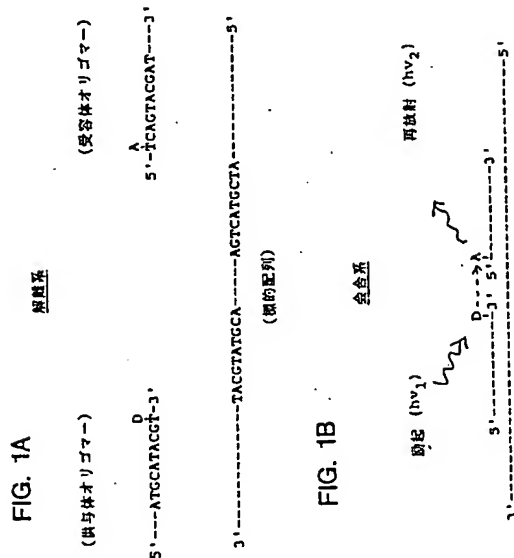


FIG. 4A

標的DNAの変性前の系

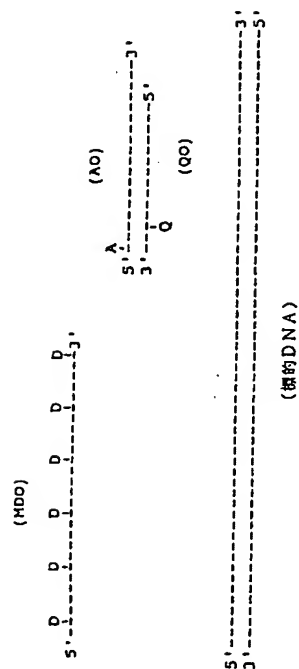


FIG. 4B

標的DNAの変性後の系

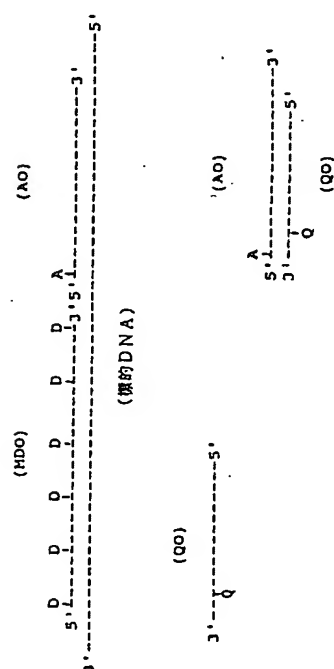


FIG. 2A

複数の供与体/受容体ポリヌクレオチド

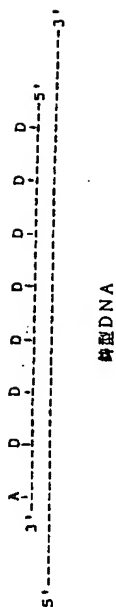


FIG. 2B

受容体  
オリゴマー

複数の供与体  
オリゴマー

複数の供与体  
オリゴマー

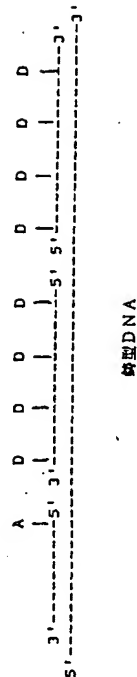


FIG. 3A

組立てられ組織化された構造

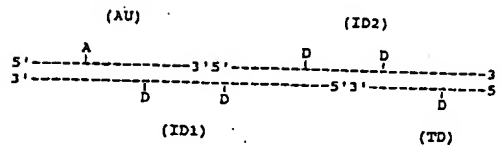
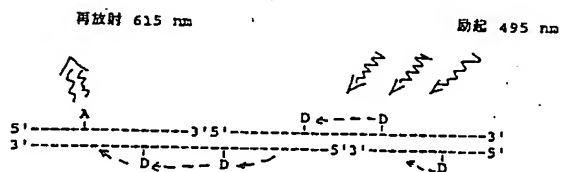


FIG. 3B

延長されたエネルギー移動



国際調査報告		International application No. PCT/JP83/00327
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(II) : C37H 3/00; C12Q 1/00 US CL : H3346 524/24.6 Answering to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation required (classification systems followed by classification symbols) U.S. : 4356, 524/24.6 Documentation included other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Extensive data have been examined during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, CA, BIOSIS, MEDLINE, search terms: Protein non-radiolabelled energy transfer, donor-to-acceptor energy transfer, and nucleic acid hybridization.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Choice of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Reference to claim No.
Y	U.S.A. 4,996,143 (Miller et al.) 26 February 1991, columns 3, line 33, column 4, line 34 and 44-46, Figure 3, claims 14, 15, 17, 21.	1-21
Y	U.S.A. 4,888,103 (Cheruvuempalle et al.) 17 September 1989, column 10, line 1-44, and column 27, line 27 to column 28, line 34.	1-21
Y	PNAS, Volume 83, issued December 1982, Cavalli et al. "Detection of Nucleic Acid Hybridization by nonradioactive Phosphorescence energy transfer", pages 5790-5794, page 5791, Figure 1a.	1-21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See parent family groups.		
*A* Inventorship of cited documents *B* Documents published prior to the international filing date or priority date but not so published in the languages and that is considered to be of potential relevance *C* Other documents published on or after the international filing date *D* Documents which may have priority or priority claims or which are cited or contain the application data of another national or other patent claims for protection *E* Documents relating to an oral disclosure, use, exhibition or other event *F* Documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *G* Documents published after the international filing date or priority date but not so published in the languages and that is considered to be of potential relevance *H* Documents of particular relevance to the claimed invention, which are considered to be of particular interest to the applicant or which are considered to be of particular interest to the public *I* Documents of particular relevance to the claimed invention, which are considered to be of particular interest to the applicant or which are considered to be of particular interest to the public *J* Documents of particular relevance to the claimed invention, which are considered to be of particular interest to the applicant or which are considered to be of particular interest to the public		
Date of the actual completion of the international search 08 January 1993		Date of mailing of the international search report 24 JAN 1993
Name and mailing address of the ISA/ Communications of Patent and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20541 Fax/Telex No. NOT APPLICABLE Form PCT/ISA/210 (Issued sheet 1/July 1992)		Authorized officer PAUL B. TRAN, PH.D. Tulington Mo. (631) 308-3127

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

G 0 1 N 33/566

識別記号

庁内整理番号

9015 -2 J

F I

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**